

Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin
Universitätsklinik des Saarlandes, Homburg/Saar

Beurteilung der Spermienqualität, insbesondere nukleärer und mitochondrialer DNA nach mehreren Einfrier- und Auftauzyklen.

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors in der Medizin
der Universität des Saarlandes

2017

Vorgelegt von: Carolin Müller
Geboren am 11.05.1991 in Pegnitz

Für meine Eltern.

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index (= Körpermasseindex)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (= deoxyribonucleic acid)
ggf.	gegebenenfalls
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IQR	Interquartilsabstand (= interquartile range)
IVF	In-Vitro-Fertilisation
Leukos	Leukozyten
Mill.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mtDNA	mitochondriale DNA
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (= phosphate buffered saline)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
SD	Standardabweichung
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling
v.a.	vor allem
WHO	Weltgesundheitsorganisation (= World Health Organization)
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Englische Zusammenfassung (Summary)	4
2	Einleitung	6
2.1	Aufbau und Funktion von Spermien	8
2.1.1	Aufbau der Spermien	8
2.1.2	Die Spermatogenese und Spermiogenese	9
2.1.3	Das Ejakulat	11
2.1.4	Die Konzeption	11
2.2	DNA – Aufbau	12
2.2.1	Die nukleäre DNA	12
2.2.2	Die mitochondriale DNA (= mtDNA)	14
2.3	Apoptose	15
2.3.1	Extrinsischer Signalweg der Apoptose	15
2.3.2	Intrinsischer Signalweg der Apoptose	16
2.4	DNA - Schäden und Beeinflussung der Spermatogenese	18
2.4.1	Prätestikuläre Faktoren	18
2.4.2	Einflussfaktoren auf testikulärer Ebene	18
2.4.3	Posttestikuläre Schäden	20
2.5	Kryokonservierung	21
2.6	Fragestellung	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Probengewinnung und Aufbereitung	24
3.1.1	Alter und BMI	24

3.2	Anfertigung von Ausstrichpräparaten	26
3.3	Konventionelles Spermogramm	27
3.3.1	Volumenanalyse	27
3.3.2	pH-Bestimmung.....	27
3.3.3	Viskosität	27
3.3.4	Ermittlung der Gesamtspermienzahl und Spermatozoendichte	28
3.3.5	Analyse der Motilität.....	29
3.3.6	Bestimmung der Vitalität	29
3.3.7	Analyse der Morphologie	31
3.3.8	Leukozytenbestimmung mittels Peroxidase	36
3.3.9	Mixed Antiglobulin Reaction - Test (MAR)	37
3.3.10	Ermittlung allgemeiner Patientendaten.....	38
3.4	Apoptosebeurteilung.....	38
3.4.1	Nukleäre DNA	38
3.4.2	Mitochondriale DNA.....	41
3.5	Kryokonservierung.....	45
3.5.1	Gefriervorgang	45
3.5.2	Auftauen	47
3.6	Standardlösungen.....	48
3.6.1	Herstellung PBS	48
3.6.2	Gefrierlösung.....	48
3.7	Statistik	49
3.7.1	Deskriptive Statistik.....	49
3.7.2	Verallgemeinerte Schätzgleichung.....	49
4	Ergebnisse	52
4.1	Deskriptive Statistik	52

4.1.1	Gesamtspermienzahl, Volumen, Spermatozoendichte	54
4.1.2	Motilität.....	55
4.1.3	Vitalität	56
4.1.4	Morphologie	56
4.1.5	Peroxidase und MAR	58
4.1.6	DNA Tunel positiv	58
4.1.7	Caspase 3 positiv	59
4.1.8	pH	60
4.1.9	Viskosität	60
4.2	Verallgemeinerte Schätzgleichung	61
4.2.1	Gesamtmotilität	61
4.2.2	Vitalität	62
4.2.3	Morphologie abnormal insgesamt	63
4.2.4	DNA Tunel positiv	64
4.2.5	Caspase 3 positiv	65
4.3	Zeitlicher Verlauf	67
5	Diskussion	68
5.1	Entwicklung der einzelnen Spermienparameter nach Kryokonservierung.....	68
5.1.1	Gesamtspermienzahl.....	69
5.1.2	Motilität.....	69
5.1.3	Vitalität	70
5.1.4	Morphologie	71
5.1.5	Peroxidase	72
5.1.6	MAR	73
5.1.7	DNA Tunel positiv	73
5.1.8	Caspase 3 positiv	74

5.1.9	pH und Viskosität	75
5.1.10	Alter	76
5.1.11	BMI	77
5.2	Assoziation der einzelnen Parameter	78
5.2.1	Gesamtmotilität	78
5.2.2	Vitalität (Eosin)	80
5.2.3	Abnormale Morphologie	81
5.2.4	DNA Tunel positiv	83
5.2.5	Caspase 3 positiv	87
5.3	Prädiktion der Schädigung durch Kryokonservierung	90
5.4	Schlussfolgerung	91
6	Literaturverzeichnis	93
7	Danksagung	107
8	Anhang	108

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Laut Daten des Deutschen IVF Registers wurden bis heute mehr als 5 Millionen Kinder weltweit mithilfe reproduktionsmedizinischer Verfahren zur Welt gebracht. Die Reproduktionsmedizin entwickelt weiterhin neue Techniken und Methoden, um bessere Ergebnisse in der Kinderwunschbehandlung zu erzielen. Denn die Anzahl an ungewollt kinderlosen Paaren ist in Deutschland und auf der ganzen Welt unverändert hoch. Auch die Rate an Tumorerkrankungen, wie beispielsweise Hodenkrebs und andere Erkrankungen, die mit einer reduzierten Spermienqualität einhergehen, sind längst Teil des klinischen Alltags. Diesen Patienten und vielen mehr kann die heutige Medizin helfen, ihr Wunschziel (ein Kind zu bekommen) zu erreichen. Ein wichtiger Bestandteil, vor allem im Hinblick auf die „Haltbarmachung“ der Spermien, ist und bleibt die Kryokonservierung. Wie bereits durch viele vorhergehende Studien bekannt ist, kommt es durch die Kryokonservierung zur negativen Beeinflussung von Spermienparametern. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der Kryokonservierung auf das Überleben der Spermien und die einzelnen Spermienparameter untersucht. Außerdem wurde geprüft, inwiefern diese Parameter miteinander assoziiert sind. Dafür wurden insgesamt 40 Spermienproben gesammelt und insgesamt fünfmal eingefroren und wieder aufgetaut, um einen möglichen „Trend“ der einzelnen Parameter besser beurteilen zu können.

An der vorliegenden Studie nahmen insgesamt 40 freiwillige Probanden im Alter von 20 bis 44 Jahren teil, deren Ejakulat nach Standards der Weltgesundheitsorganisation (WHO) auf Gesamtspermienzahl, Motilität, Vitalität und Morphologie untersucht wurde. Zusätzlich wurde der Body-Mass-Index (BMI) der Probanden, die Leukozytenzahl und das Vorhandensein von Spermienantikörpern im Ejakulat bestimmt. Eine mögliche Schädigung der nukleären Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde per Tunel (terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling-) Test geprüft. Die mitochondriale, intrinsisch ausgelöste Apoptose wurde durch den Anteil der Expression von Caspase 3 (Antibody to Active Caspase 3 FITC Detection Kit) beurteilt. Die Tests wurden nativ und nach jedem Gefriervorgang durchgeführt.

Die Gesamtmotilität betrug nativ im Mittel 70 %, nach dem fünften Gefriervorgang lag die Motilität bei durchschnittlich 0 %. Die Messung der Vitalität zeigte nativ 66,5 %, nach dem

letzten Gefriervorgang 3 % vitale Spermien. Die abnormale Morphologie nimmt leicht von nativ 95,9 % auf 98,3 % zu. Ebenso kommt es zur Zunahme der DNA-Fragmentierung, von 22,04 % nativ, auf 67,58 %. Die mitochondriale Apoptose erfährt einen Zuwachs von nativ 7,8 % auf 45,25 % nach dem letzten Gefriervorgang.

Außerdem bestehen ausgeprägte Zusammenhänge der einzelnen Spermienparameter die mithilfe einer verallgemeinerten Schätzgleichung ermittelt wurden. Wichtig ist hierbei zu beachten, dass die ermittelten Zusammenhänge der Parameter stets über die Zeit mehrerer Gefrier- und Auftauvorgänge bestehen. Zur besseren Übersicht wird dies in einer Tabelle dargestellt:

Abhängige Variable	Positiver Zusammenhang	Negativer Zusammenhang
Motilität	Gesamtspermienzahl, Vitalität	Abnormale Morphologie, DNA-Fragmentierung, mitochondriale Apoptose
Vitalität	Gesamtmotilität	Abnormale Morphologie
Abnormale Morphologie	DNA-Fragmentierung, mitochondriale Apoptose	Motilität, Vitalität
DNA-Fragmentierung	Abnormale Morphologie, mitochondriale Apoptose	Gesamtspermienzahl, Motilität, Vitalität
Mitochondriale Apoptose	Abnormale Morphologie, DNA-Fragmentierung	Gesamtspermienzahl, Motilität, Vitalität

*Tabelle 8
Zusammenhänge der Spermienparameter*

Weitere Einflussfaktoren auf die Resistenz der Spermien stellen in unserer Studie das Alter und der BMI dar. Die DNA-Fragmentierung und die mitochondriale Apoptose zeigen einen positiven Zusammenhang mit dem Alter der Probanden. Außerdem konnte eine positive Assoziation zwischen BMI und Gesamtmotilität beobachtet werden. Ein höheres Auftreten von Antikörpern scheint keinen Einfluss auf die Resistenz der Spermien zu haben.

Insgesamt kann eine deutliche Verschlechterung der Spermienparameter durch die wiederholte Kryokonservierung festgestellt werden. Es kommt zur exponentiellen Abnahme der Gesamtmotilität und der Spermiovitalität. Diese Werte scheinen am anfälligsten für die Schädigung durch das Einfrieren. Außerdem kommt es zur linearen Zunahme der abnormalen Morphologie, der DNA-Fragmentierung und der mitochondrialen Apoptose.

Es sind noch weitere Studien und Forschung nötig, um die entstandene Schädigung der Spermien weitestgehend gering zu halten. Insbesondere die Protektion von Motilität und

Vitalität der Spermien könnte bei zukünftigen Studien im Vordergrund stehen, da diese beiden Parameter besonders stark durch die Kryokonservierung beeinflusst werden.

1.2 Englische Zusammenfassung (Summary)

For many years, medicine is in search of new methods and technologies improving the results of the artificial reproductive technology. The number of couples, who can't have children despite their wish, is unchanged high. There can be a reduction of sperm quality without an underlying medical condition. Next to that, especially malignant diseases, which need chemotherapy, can be the cause of infertility. A very important part for the "preservation" of sperm for the artificial reproduction is the cryoconservation. Discussed in previous studies, cryoconservation has a negative influence on sperm quality. The aim of this study was to assess the influence of cryoconservation on different sperm parameters and whether they are related to each other or not. For this purpose, the sperm was frozen and thawed five times.

40 healthy men, between 20 and 44 years, participated in this study. The total sperm count, motility, vitality and morphology were determined following the standards of the World Health Organization (WHO). The presence of leukocytes and sperm antibodies in the ejaculate was documented, as well as the body mass index (BMI) of the test persons. The sperm was tested with the Tunel (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling)-test in order to assess DNA fragmentation. The mitochondrial induced apoptosis was measured by caspase 3 (Antibody to Active Caspase 3 FITC Detection Kit). The tests were performed native and after each freezing cycle.

The total native motility was 70 % on average. After the fifth freezing cycle, there were 0 % motile sperms left. The sperm vitality decreased from native 66,5 % to 3 %. There was a slight increase in the abnormal sperm morphology from 95,9 % on average to 98,3 %. There was an increase of the DNA fragmentation from native 22,04 % positive sperms on 67,58 %. The mitochondrial induced apoptosis increased from native 7,8 % to 45,25 %.

Whether the single sperm parameters were related to each other or not, was analyzed by the generalized estimating equation (GEE) - analysis. The results were documented in a table to get a better overview:

dependent variable	positive association	negative association
motility	total sperm count, vitality	abnormal morphology, DNA fragmentation, mitochondrial induced apoptosis
vitality	motility	abnormal morphology
abnormal morphology	DNA fragmentation, mitochondrial induced apoptosis	motility, vitality
DNA fragmentation	abnormal morphology, mitochondrial induced apoptosis	total sperm count, motility, vitality
mitochondrial induced apoptosis	abnormal morphology, DNA fragmentation	total sperm count, motility, vitality

Table 8

Associations between sperm parameters

We figured out age as a negative influence factor for the test results of the Tunel test and the caspase 3 after cryoconservation. The BMI of the test persons is positively associated with the sperm motility over the time. There was no link between the Mixed Antiglobulin Reaction Test (MAR) and other sperm parameters.

Overall there was a deterioration of all sperm parameters over the five freezing cycles. We could see an exponential decrease of sperm motility and vitality. Our data suggest that these two parameters are particularly vulnerable to freezing. There is a linear increase of DNA fragmentation and apoptosis over the five freezing cycles and we observed a slight linear increase of abnormal sperm morphology over time.

Further studies are needed to create new procedures preventing cryoinjury on sperm. Especially, to protect sperm motility and vitality, as they were strongly influenced by cryoconservation.

2 Einleitung

Die Rolle der Reproduktionsmedizin hat in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. 1982 erblickte das erste durch künstliche Befruchtung in Deutschland entstandene Kind, Oliver W., an der Universitätsklinik Erlangen das Licht der Welt [10]. Damals war dies für viele Menschen undenkbar und ein Skandal. Heute, fast 35 Jahre später, ist die Reproduktionsmedizin vollkommen etabliert und stellt einen festen Bestandteil in der klinischen Patientenversorgung dar. Nach Schätzungen hat jedes 6. bis 7. Paar Schwierigkeiten selbst eine Schwangerschaft herbei zu führen und benötigt ärztliche Unterstützung [20]. Daten des Deutschen IVF-Registers zufolge wurden 1997 bis einschließlich 2014 in Deutschland etwa 230 000 Kinder nach künstlicher Befruchtung mittels In-Vitro-Fertilisation (IVF) und Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) geboren. Weltweit waren es mehr als 5 Millionen [32]. Was bedeutet, dass etwa 2,5 % der neugeborenen Kinder im Jahr 2014 mit Hilfe künstlicher Befruchtung gezeugt wurden. Statistisch gesehen sitzt also in fast jeder Schulklasse ein solches Kind [32].

Zur Durchführung der assistierten Reproduktion hat die Bundesärztekammer Richtlinien herausgegeben, in der die verschiedenen Indikationen aufgelistet sind. Hierzu zählen unter anderem Follikelreifungsstörungen, tubare Insuffizienz, somatische Ursachen (Hypospadie, retrograde Ejakulation, Zervikal-Kanal-Stenose), männliche Fertilitätsstörungen aber auch idiopathische Ursachen [19]. Nicht zu vergessen ist auch die Kryokonservierung von Spermien bei maligner Grunderkrankung, wie beispielsweise bei Hodenkarzinom oder Lymphomen, die gehäuft auch schon im jungen Lebensalter auftreten. Die aggressive Chemotherapie oder eine gegebenenfalls nötig werdende Operation kann bis zur Azoospermie führen. Hier kann durch die Kryokonservierung von Sperma vor Beginn der Therapie die Möglichkeit geschaffen werden, weiterhin Kinder zu zeugen [124]. Laut einer Studie des Asian Journal of Andrology waren die Erfolgsraten nach ICSI und Insemination bei Patienten, bei denen eine Kryokonservierung aufgrund malignem Grundleiden stattfand, ebenso erfolgreich wie bei „gesunden“ Männern, die aus anderen Gründen von der Kryokonservierung Gebrauch machten [14]. Ein weiterer Einsatzort der künstlichen Befruchtung liegt bei bestehendem Kinderwunsch und HIV-Positivität des Mannes vor. Um eine Übertragung des Virus zu vermeiden, empfiehlt man den Paaren eine Verhütung mittels Kondom. Es kommt somit nicht zur Befruchtung und zum gewünschten Kind. Allerdings wies Semprini et al., (1992) die erfolgreiche Elimination von HIV1-positiven Zellen im Ejakulat

nach Zentrifugation und „swim-up“ (=Isolierung der beweglichsten und schnellsten Spermien) nach. So entstand keine einzige Transmission des HI-Virus nach Insemination auf die schwangere Frau oder das Kind [111]. 2007 konnte die Transmission auch bei HIV-positivem Mann mit Azoospermie verhindert werden. Dazu wurden Spermien durch Punktion des Nebenhodens gewonnen und anschließend zur Elimination des Virus aufbereitet. Nach ICSI kam es zur Geburt gesunder Zwillinge [18].

So haben nicht nur die „klassische“ Reproduktionsmedizin aufgrund von Infertilität, sondern auch ihr breiter Einsatzbereich und die möglichen Indikationen stark zugenommen. IVF und ICSI helfen dabei kinderlosen Paaren die Chance auf eine Schwangerschaft zu erhöhen. Im Jahr 2014 betrug die Schwangerschaftsrate nach Embryonentransfer 31,9 %, wobei 72,7 % davon zur Geburt eines gesunden Kindes führten. Insgesamt spricht man von einer „Baby-Take-Home“- Rate von 20,5 % [32].

IVF und ICSI bieten heutzutage die einmalige Chance ungewollt kinderlosen Paaren ihren Traum von Familie und eigenen Kindern zu erfüllen. Nichtsdestotrotz gibt es meist noch keine Langzeitergebnisse von Kindern mit ICSI. Es ist bekannt, dass nach ICSI Therapie aufgrund schwerer Oligo- oder Azoospermie ein etwa 30 % höheres Risiko für kongenitale Fehlbildungen besteht, als bei natürlicher Befruchtung [51]. Unklar ist noch, ob es auch zur Übertragung genetischer Defekte oder einer Vererbung der paternalen Infertilität kommt. Betroffen könnten v.a. Männer mit Y-Chromosom-Defekten sein [51]. Es wird daher dringend empfohlen, alle Paare mit ICSI – Wunsch ausreichend und über mögliche Risiken und Folgen zu informieren.

Wichtig für die erfolgreiche Durchführung von IVF und ICSI ist die in vielen Fällen vorher durchgeführte Kryokonservierung. Ohne diese „Haltbarmachung“ der Spermien und Eizellen könnte die Reproduktionsmedizin nicht in der heutigen Form existieren. Im Folgenden sollen die Einflüsse der Kryokonservierung auf die Spermien dargestellt werden. Insbesondere wird ihr Einfluss auf die nukleäre und mitochondriale DNA genauer betrachtet. Zum besseren Verständnis der biologischen Prozesse wird einleitend im Allgemeinen auf Spermien, Apoptose und Kryokonservierung eingegangen.

2.1 Aufbau und Funktion von Spermien

2.1.1 Aufbau der Spermien

Spermium bezeichnet die reife männliche Keimzelle. Wie in Abbildung 1 zu erkennen, besteht sie aus einem Kopf, einem Mittelstück und einem Schwanz, der als Schubgeißel für die Beweglichkeit des Spermiums sorgt [110].

Im Spermienkopf befinden sich der Kern, der die nukleäre DNA trägt und das einzige Spermien-spezifische Organell, der Akrosom-Komplex. Dieser enthält die Akrosom-Vakuole, welche ein Derivat des Golgi-Apparates aus fusionierten Lysosomen darstellt und entscheidend ist für die Befruchtung der Eizelle [41][59]. Im Mittelstück befindet sich die Zentriole, die den Ursprung des Axonemas darstellt. Das Axonema besteht aus einem äußeren Ring aus neun Doppelmikrotubuli und Dyneinarmen, sowie zwei zentral gelegenen Mikrotubuli, die für die Motilität des Spermiums entscheidend sind [41]. Das Axonema setzt sich in den Schwanz fort. Bei Dysfunktion kann es in Folge zur Immotilität der Spermien und damit zur Sterilität des Mannes kommen [69]. Ebenfalls im Mittelstück befinden sich die Mitochondrien. Sie besitzen eine eigene DNA und dienen außerdem der Bereitstellung von Energie für die Fortbewegung. Cassina et al., (2015) fanden heraus, dass die Mitochondrien die Hauptquelle von Sauerstoffradikalen (englisch: reactive oxygen species, ROS) in Spermien sind. Die ROS wiederum können negativen Einfluss auf die Intaktheit der Zellmembranen, DNA und die Mitochondrien haben [22].

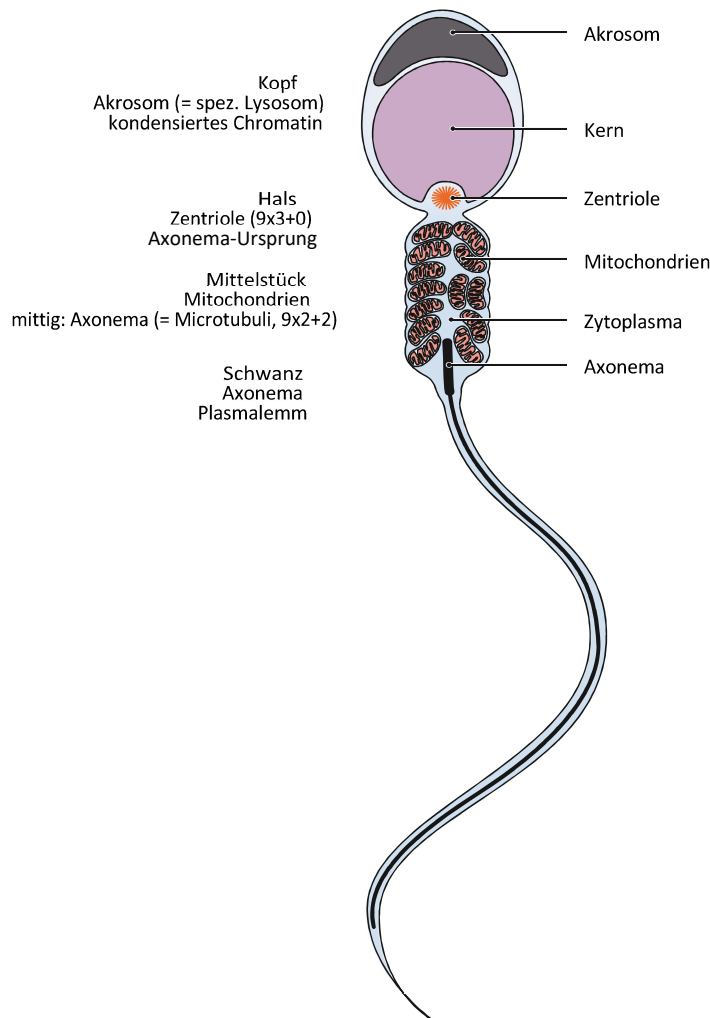


Abbildung 1
Typischer Aufbau eines reifen Spermiums (Spermatozoon)
MEDI-LEARN Skript Histologie 3, 6. Auflage, Abbildung 23 [76]

2.1.2 Die Spermatogenese und Spermiogenese

Mit dem Beginn in der Pubertät findet die Bildung und Ausreifung geschlechtsreifer Spermien statt. Bis zur kompletten Ausreifung eines Spermiums vergehen in etwa 64 Tage. Die Produktion wird durch die Hormone LH und FSH stimuliert [56]. Insgesamt werden täglich bis zu 2×10^8 Spermien gebildet [84]. Der Ablauf der Spermatogenese und Spermiogenese ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Den ersten Schritt stellt hierbei die Spermatogenese dar. Die sogenannten „Stamm-Spermatogonien“ differenzieren sich zu A-Spermatogonien, welche sich mitotisch in zwei gleiche Zellen teilen. Eine davon bleibt als Stammzelle zurück und sichert somit zeitlebens eine konstante Produktion [84]. Die andere differenziert sich weiter zur B-Spermatogonie. B-Spermatogonien reifen, teilen sich ebenfalls mitotisch und wandern in Richtung Tubuli

semiferi contorti. Sie werden nun als Spermatozyten bezeichnet und durchlaufen die 1. und 2. Reifeteilung (Meiose I & II), aus einem Spermatozyt entstehen insgesamt vier Spermatisden, wovon die Hälfte jeweils ein X-, die andere Hälfte ein Y-Chromosom trägt. Bei der Meiose kommt es zur Teilung des Chromosomensatzes und es entstehen somit unterschiedliche Zellkerne [150] [11].

Im Anschluss findet die Spermiogenese statt. Sie dient der Ausreifung der Spermatisden zu Spermien. Es kommt zur Ausbildung des Akrosoms und einer Schubgeißel, sowie zur Kernkondensation und Zellplasmaverlust bis die Spermien dann letztendlich in die Hodenkanälchen abgegeben werden [11]. Nach Übergang in die Tubuli seminiferi recti, wandern die Spermien weiter in das Rete testis und schließlich in ca. 12 Ductuli efferentes testis [110] [84]. Diese münden in den Nebenhoden in dem die Spermien weiter reifen und gespeichert werden [110].

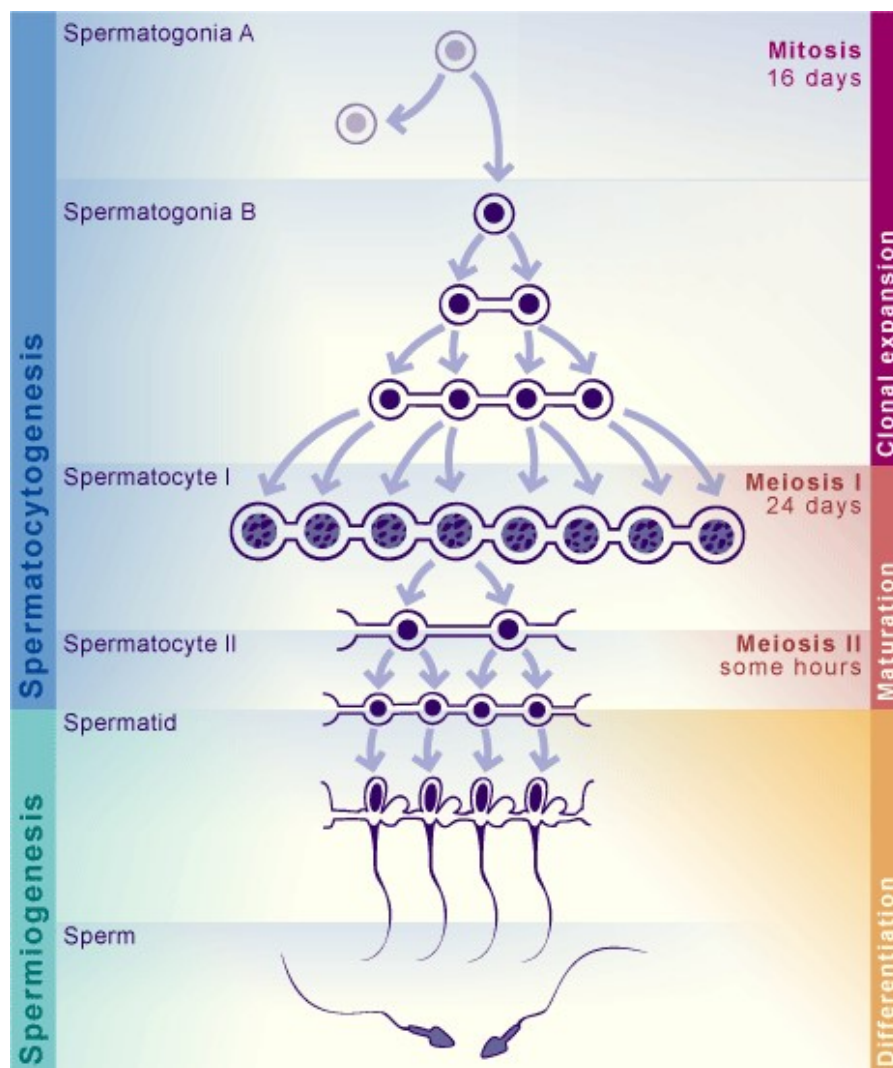


Abbildung 2

Ablauf der Spermatogenese und Spermiogenese (www.embryology.ch) [141]

2.1.3 Das Ejakulat

Nach Bildung und Reifung der Spermien in Testis und Epididymis wandern die Spermien bei der Ejakulation durch den Ductus deferens in Richtung Prostata. Dort wird das Ejakulat mit der leicht basischen Samenflüssigkeit der Glandulae vesiculosae versetzt, das ca. 70 % der Gesamtflüssigkeit ausmacht und reich an Fructose ist. Dies dient als Energielieferant für die Spermien [110]. Das Ejakulat zieht nun im Ductus ejaculatorius durch die Prostata. Diese bildet die restlichen 30 % der Samenflüssigkeit, mit dem das Ejakulat versetzt wird [110]. Auf Höhe des Musculus perinei profundus münden schließlich noch die Ausführungsgänge der Glandulae bulbourethrales, die wasserklares Sekret bilden und den Durchtritt des Ejakulats durch die Urethra erleichtern [85].

2.1.4 Die Konzeption

Beim Geschlechtsverkehr können 100 - 500 Millionen Spermien durch den Mann abgegeben werden. Ein Großteil stirbt normalerweise im sauren Scheidenmilieu, doch während der Ovulation ändert sich die Zusammensetzung des Zervikalsekrets. So wird während der Ovulation eine Aszension der Spermien in den Uterus und anschließend in die Tube erleichtert [24]. Treffen sie dort auf eine ovulierte Eizelle kann es zur Kapazitation oder auch Akrosomreaktion kommen [25]. Die Intaktheit des Akrosoms stellt hierbei eine entscheidende Rolle für die erfolgreiche Kapazitation dar [59]. Das Akrosom wird durch von der Eizelle produziertes Glykoprotein aufgelöst. So kommt es dazu, dass das Spermium an der Eizellenoberfläche Fertilisin (= Proteasen) freisetzt. Dies ist nötig, dass das Spermium die Eizellenhülle bestehend aus Corona radiata und Zona pellucida überwindet [125]. Auch die Zellen der Corona radiata und Zona pellucida haben einen wichtigen Einfluss auf die erfolgreiche Befruchtung der Eizelle. So konnte ein Zusammenhang zwischen der Proliferationskapazität dieser Zellen und der Schwangerschaftsrate festgestellt werden [49]. Das anschließende Eindringen der Spermienzelle in die Eizelle wird als Imprägnation bezeichnet. Die haploiden Chromosomensätze der Eizelle und des Spermiums verschmelzen schließlich zu einem diploiden Chromosomensatz und bilden die sogenannte Zygote [125].

2.2 DNA – Aufbau

Die DNA trägt die genetische Information und kontrolliert somit alle Vererbungsvorgänge im menschlichen Körper. Sie besteht aus vier verschiedenen Bausteinen, den Nukleotiden. Die Untereinheiten werden jeweils aus einem Zuckermolekül, der Desoxyribose, einem Phosphatrest und einem Purin (= Adenin und Guanin), bzw. einem Pyrimidin (= Cytosin und Thymin) gebildet. Wobei der Phosphatrest und die Desoxyribose untereinander Phosphodiester-Bindungen ausbilden, was das sogenannte „Zucker-Phosphat-Rückgrat“ bildet [60].

2.2.1 Die nukleäre DNA

Die nukleäre DNA bezeichnet die DNA die im Zellkern zu finden ist. Charakteristisch für sie ist die Anordnung als Doppelhelix. Diese kommt dadurch zustande, dass sich zwei DNA-Stränge antiparallel aneinanderlegen, d.h. an einem Ende der Helix hat ein DNA-Strang sein 3'OH-Ende und der andere Strang sein 5'OH-Ende. Die DNA-Stränge sind durch Wasserstoffbrücken verbunden, die durch komplementäre Basenpaare gebildet werden. Ein Paar bildet Adenin und Thymin, das andere Guanin und Cytosin. Dies stellt die Grundlage für den exakten Replikationsmechanismus dar, bei dem sich die Doppelhelix auflöst und dann an jedem Einzelstrang ein neuer komplementärer Strang synthetisiert werden kann [60]. Der Aufbau der DNA ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

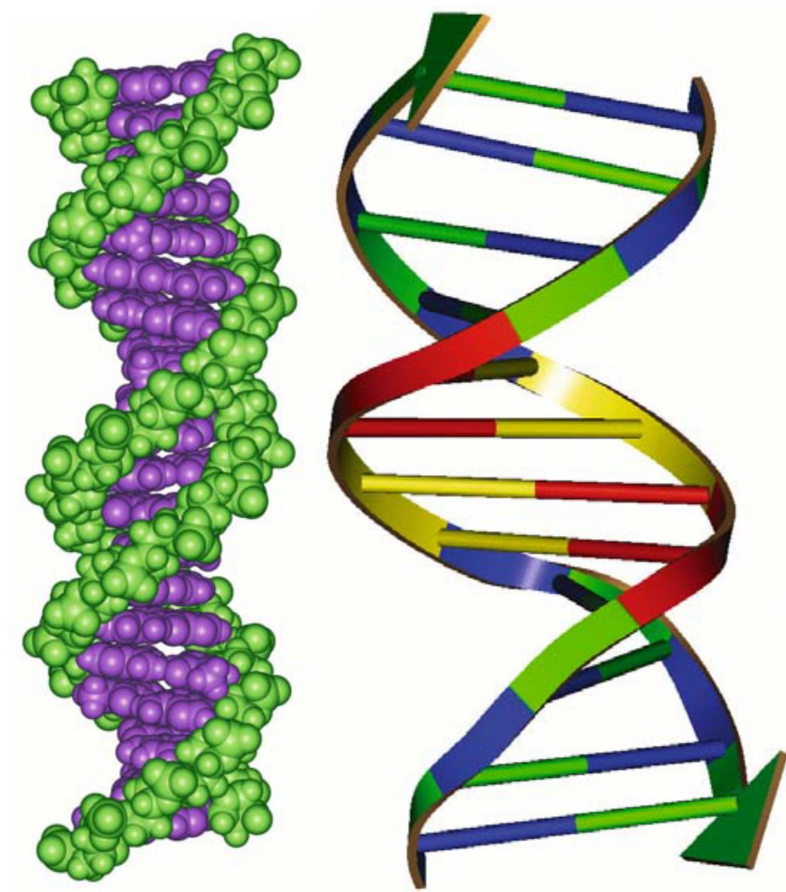


Abbildung 3

Die Struktur der DNA-Doppelhelix.

Auf dem linken Bild ist das DNA-Rückgrat bestehend aus Desoxyribose und Phosphat grün gefärbt. Die Basen stellen sich violett dar.

Rechts wird der antiparallele Verlauf der beiden DNA-Stränge verdeutlicht mit den korrespondierenden Basenpaaren (Guanin = grün, Cytosin = blau, Adenin = rot, Thymin = gelb)

Georg Löffler, Petro E. Petrides PCH (2007) Biochemie und Pathobiochemie, 8.Auflage, S.148 [46]

Insgesamt besteht die DNA eines Menschen aus ca. $6,4 \times 10^9$ Basenpaaren. Wie in Abbildung 4 dargestellt bildet die DNA einzelne Chromatinfäden, die mithilfe von Histonen „gepackt“ werden und im Zellkern als Chromosomen vorliegen [102].

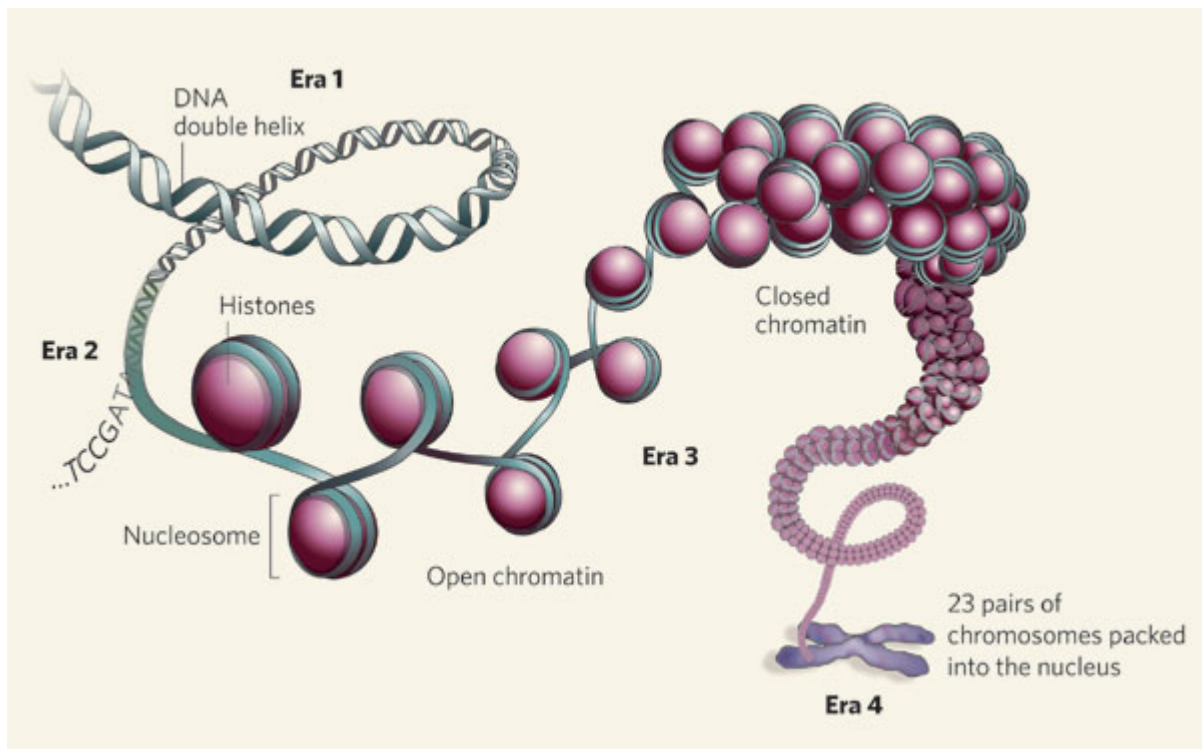


Abbildung 4

Verpackung der DNA-Doppelhelix mithilfe von Histonen bis zur „Lagerung“ im Zellkern in Form von Chromosomen; www.visembryo.com [142]

2.2.2 Die mitochondriale DNA (= mtDNA)

Die mtDNA liegt als Doppelstrang zirkulär geformt in der Matrix der Mitochondrien vor. Sie kodiert für einige mitochondriale Proteine, sowie mitochondriale Ribosomen an denen die Proteine synthetisiert werden können. Der Großteil der mitochondrialen Proteine wird allerdings im Zellkern synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien transportiert [101]. Aufgrund der eigenen DNA, sowie der Vermehrung der Mitochondrien durch Teilung geht man heute davon aus, dass die Mitochondrien ursprünglich eine Art Bakterium waren, das von einem Eukaryoten phagozytiert wurde (= Endosymbiontentheorie) [101]. In den Mitochondrien läuft die Atmungskette ab, sie sind somit der wichtigste Energielieferant der Zelle [47].

Insgesamt ist die in den Mitochondrien liegende DNA im Vergleich zur nukleären DNA um einiges ungeschützter. So kommt es 10 bis 50 Mal häufiger zu Defekten der mitochondrialen im Vergleich zur nukleären DNA. Hauptgrund spielt zum einen der fehlende Schutz durch Histone und Kondensation, die Nähe zu ROS im Rahmen der Atmungskette und die nur eingeschränkte Fähigkeit zur DNA-Reparatur [123].

Eine weitere Besonderheit stellt die Vererbung der mtDNA dar. Diese wird bei Säugetieren ausschließlich über die Mutter vererbt [31]. Es wird angenommen, dass es nach der Kapazitation zur Ubiquitinierung (= Markierung mittels Ubiquitin) der paternalen mtDNA kommt und diese somit anschließend durch Proteasomen abgebaut wird [123]. Außerdem soll es bei der mtDNA des Spermiums zur Autophagie kommen [123]. Larssen et al., (1997) haben des Weiteren herausgefunden, dass es bereits bei der Spermatogenese zur Down-Regulation des mitochondrialen Transkriptionsfaktor A kommt [66]. Somit enthalten die Mitochondrien der Spermien bereits vor der Kapazitation viel weniger mtDNA als die der Oozyten.

2.3 Apoptose

Die Apoptose ist der durch die Zelle selbst ausgelöste und kontrollierte, programmierte Zelltod. Dieses System ist unerlässlich zur Beseitigung defekter oder infizierter Zellen, aber auch um eine Homöostase der Zellzahl, zwischen neugebildeten und älteren, geschädigten Zellen aufrecht zu halten [109].

Wichtiger Effektor im Rahmen der Apoptose sind die Caspasen. Sie liegen als inaktive Vorstufen im Zytoplasma vor und können kaskadenartig durch Proteolyse aktiviert werden. Dabei gibt es unterschiedliche Auslöser, die die Apoptose in Gang setzen können [7] [103].

2.3.1 Extrinsischer Signalweg der Apoptose

Der extrinsische Weg wird auch als rezeptorvermittelte Apoptose bezeichnet, da hier Liganden an einen sogenannten Todesrezeptor binden. Hierzu zählen z.B. die TNF-Rezeptoren (Fas, TRAIL) [147]. Der Todesrezeptor wird exprimiert, es kommt zur Ligandenbindung und Trimerisierung, d.h. es bindet zusätzlich ein Adaptermolekül intrazellulär. Der entstandene Proteinkomplex wird DISC (= Death-inducing signalling Complex) genannt [7] [109]. Intrazellulär wird Procaspase 8 gebunden, welche zu Caspase 8 aktiviert wird und die Signalkaskade mit Aktivierung von Caspase 3, 6 und 7 in Gang setzt (siehe Abbildung 5) [109].

Diese sogenannten Effektorcaspasen führen zur Zerstörung zahlreicher lebensnotwendiger Proteine. Durch Abbau des Zytoskeletts kommt es zur Auflösung der Kernlamina. Die sich darin befindliche DNA liegt anschließend ungeschützt und frei im Zytoplasma vor. Gleichzeitig wird die Endonuklease CAD freigesetzt, die zusammen mit Endonuklease G die

freigesetzte DNA fragmentiert und somit zerstört. Normalerweise wird CAD durch das Protein ICAD inaktiviert. Im Rahmen der Signalkaskade kommt es zur Spaltung von ICAD durch die Caspasen [103].

Wie in Abbildung 5 zu sehen, kann die im extrinsischen Signalweg entstandene Caspase 8 ebenfalls die intrinsische Signalkaskade auslösen. Es kommt hierbei zur Potenzierung eines pro-apoptotischen Proteins (Bid) in der äußeren Mitochondrienmembran [103].

Insgesamt ist der bedeutendste und wohl auch bekannteste Signalweg im Testis das Fas-Fas-Ligand-System. Bei diesen führt die Expression des Fas-Liganden in Sertoli-Zellen zu Apoptose in den Keimzellen [67].

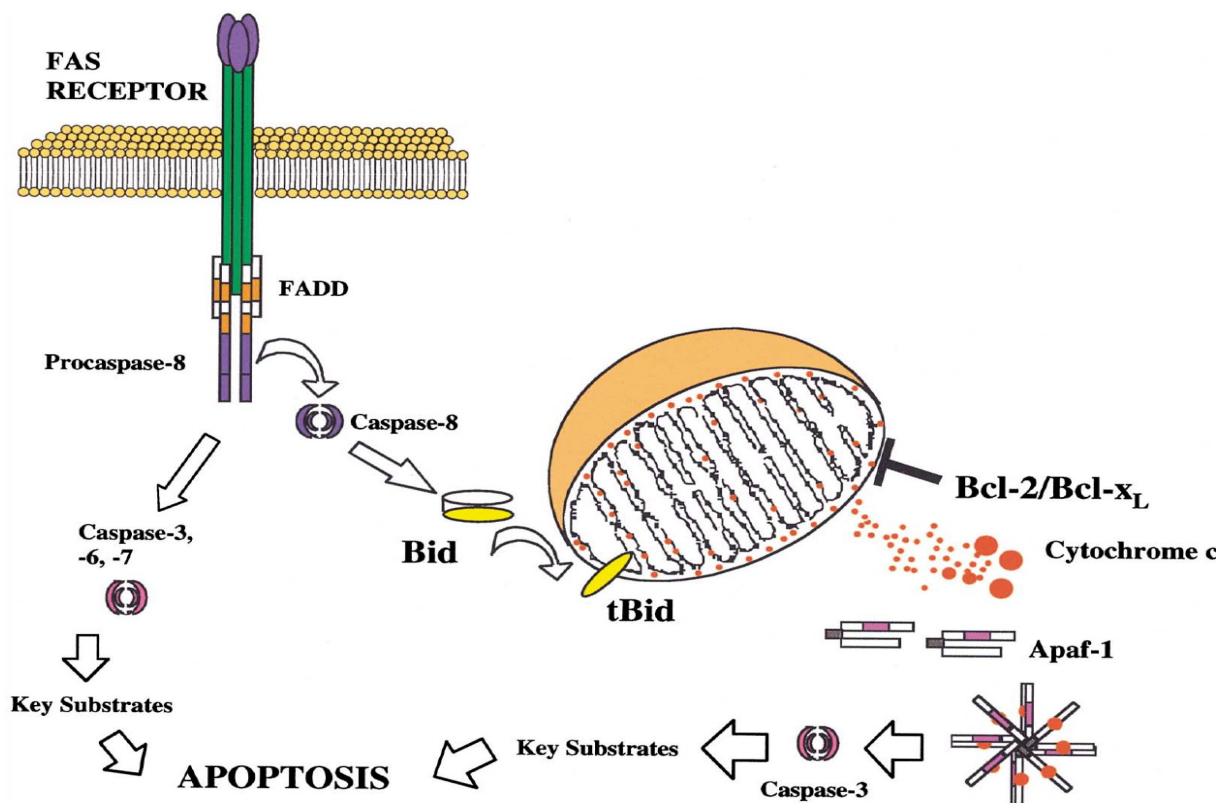


Abbildung 5

Die Apoptose ausgelöst durch Bindung des Todesrezeptors. Es kommt zur Aktivierung von Caspase 8 und nachfolgend zu Caspase 3,6 und 7. Ebenso wird durch Caspase 8 die mitochondrial vermittelte Apoptose initiiert. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR (2001) The machinery of programmed cell death [147]

2.3.2 Intrinsischer Signalweg der Apoptose

Der intrinsische Weg der Apoptose ist in Abbildung 6 dargestellt und wird zum großen Teil durch die Mitochondrien geregelt. Normalerweise herrscht ein Gleichgewicht zwischen anti-apoptotischen (Bcl-2) und pro-apoptotischen (Bak, Bax, Bid) in der äußeren Mitochondrienmembran vorliegenden Proteinen [147]. Stresssignale ausgelöst durch DNA

Schäden (= genotoxischer Stress) oder Umwelteinflüsse (= oxidativer Stress) führen zu einem Ungleichgewicht der Proteine und lösen so die Apoptose aus. Es bilden sich Permeabilitäts-Transitions-Poren in der Mitochondrienmembran, woraufhin das Membranpotential zusammenbricht. Es werden mitochondriale Apoptose-Mediatorproteine wie Cytochrom c freigesetzt. Dieses aktiviert Apoptotic Protease activating factor 1 (Apaf-1), welches sich daraufhin zum sogenannten Apoptosom transformiert und Caspase 9 aktiviert [7] [109]. Caspase 9 aktiviert die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 und es kommt zur Apoptose der Zelle [103].

Außerdem kommt es durch Einwirkung pro-apoptotischer Stimuli auf die Mitochondrien zur Ausschüttung von Smac Diablo. Dieses bindet IAPs und führt somit zur Freisetzung von Caspase 9, welches wiederum Caspase 3 aktiviert und ebenfalls zum programmierten Zelltod führt. IAPs bindet normalerweise die Caspasen und hält sie so inaktiv. [147]

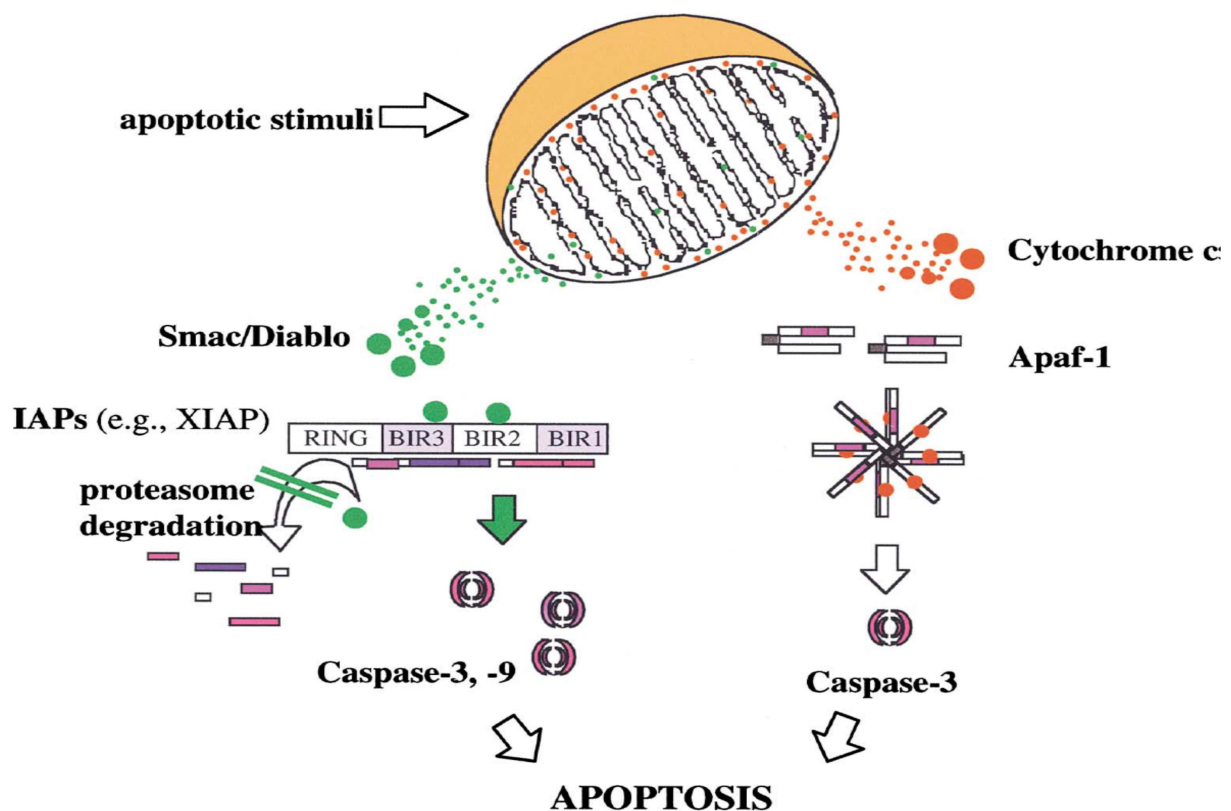


Abbildung 6

Durch pro-apoptotisch wirkende Stimuli kommt es zur Aktivierung von Cytochrom c und Smac/Diablo in den Mitochondrien. Diese führen beide zur Aktivierung von Caspase 3 und folglich zum programmierten Zelltod. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR (2001) The machinery of programmed cell death [147]

2.4 DNA - Schäden und Beeinflussung der Spermatogenese

Einflussfaktoren, die zu einer verminderten Spermatogenese führen, sind seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Zur besseren Veranschaulichung werden die Einflüsse in prätestikulär, testikulär und posttestikulär aufgeteilt.

2.4.1 Prätestikuläre Faktoren

Die testikuläre Funktion und somit die Initiierung der Spermatogenese wird im Wesentlichen durch die hypophysären Hormone FSH und LH gesteuert, die wiederum die Testosteronwirkung regulieren [84]. Das Zusammenspiel der einzelnen Hormone ist wesentlich für eine erfolgreiche Spermatogenese [135]. Kommt es zur Beeinflussung dieser Regelkreise, so spricht man vom Einfluss prätestikulärer Faktoren auf die Spermatogenese.

Die sogenannte „Östrogen-Hypothese“ postuliert, dass ein erhöhter Östrogen-Einfluss mit erniedrigten Spermienzahlen, einer erhöhten Rate an Kryptorchismus und Hodenkarzinomen einhergeht [126]. Dies betreffe z.B. Arbeitende in der pharmazeutischen Industrie. Sheiner et al., (2003) zeigten das es zu einer Feedback-Hemmung auf den Hypothalamus kommt und einem daraus resultierendem hypogonadotropen Hypogonadismus mit verminderten Testosteronspiegeln, die schließlich zu Störungen in der Spermatogenese führen können [118]. Des Weiteren wiesen Sharpe et al., (1993) eine fehlende Stimulation der Sertoli-Zellproliferation bei männlichen Feten nach, deren Mütter während der Schwangerschaft höheren Östrogendosen ausgesetzt waren [116]. Allerdings ist ein wahrer Einfluss auf die Verminderung der Keimzellen letztendlich nicht bewiesen und es gibt zahlreiche Studien, die einen Östrogen-Einfluss auf die Spermatogenese widerlegen [126]. Da der männliche Fetus intrauterin ohnehin schwangerschaftsbedingt erhöhten Östrogendosen ausgesetzt ist, ist es fraglich ob und ab welcher Dosis man überhaupt von einer zusätzlichen Östrogen-Exposition sprechen kann [86].

2.4.2 Einflussfaktoren auf testikulärer Ebene

Es sind zahlreiche Noxen und Umwelteinflüsse bekannt, die mit einer verminderten testikulären Funktion assoziiert sind. Angriffspunkt können die Keimzellen, aber auch die Leydig- und Sertoli-Zellen darstellen, was aufgrund ihrer engen Interaktion letztendlich immer zu einem pantestikulären Effekt führt [86]. Weiterhin ist es wichtig zu unterscheiden, ob die Schädigung nur die Spermatogonien der verschiedenen Reifestadien betrifft, oder die Stammkeimzellpopulation betroffen ist. Bei Schädigung letzterer ist von einem irreversiblen

Schaden auszugehen, der zu einer verminderten Produktion von Spermien, zur kompletten Azoospermie, oder auch zu irreversiblen DNA-Mutationen führen kann [84]. Bei einer Schädigung der Spermatogonien, die sich in den verschiedenen Reifestadien befinden, ist dagegen meist nur von einer vorübergehenden Infertilität auszugehen. Liegen noch intakte Stammkeimzellen vor, können theoretisch immer wieder neue Spermien produziert werden. Als negative Einflussfaktoren sind hier zunächst verschiedene Chemikalien zu nennen. Das wohl bekannteste, in Farben und Lacken vorkommende Toxin ist 2-Methoxyethanol. Es ist erwiesen, dass es dadurch zu einer erhöhten Apoptoserate der Spermien kommt [17]. Auch anderen Chemikalien, wie dem Pestizid 1,2 Dibromochloropropan, oder bestimmten Schwermetallen wie Blei und Kadmium wird ein negativer Einfluss auf die Spermatogenese angelastet [86] [118].

Weiterhin gibt es Studien, die die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika im Hinblick auf die Reproduktion beobachtet haben. Brandriff et al., (1994) untersuchten den Einfluss des MOPP-Schemas (Mechlorethamin, Vincristin, Procarbazin, Prednison) auf die Spermatogenese, dieses wird häufig zur Behandlung von Hodgkin-Patienten verwendet. Sie fanden heraus, dass es hier zur irreversiblen Schädigung der Stammkeimzellen kommt [16]. Aber auch andere Medikamente, wie beispielsweise Atorvastatin haben Einfluss auf die Reproduktion. Pons-Rejraji et al., (2014) konnten nachweisen, dass es durch Atrovastatin nicht nur zu einer schlechteren Akrosomreaktion kommt, sondern dass dessen Einnahme auch zu einer erniedrigten Vitalität, Motilität und Gesamtspermienzahl führt [98].

Auch ionisierende Strahlung wurde auf einen Effekt hin untersucht. Dazu wurden in den 1960er Jahren freiwillige Gefängnisinsassen in den USA unterschiedlichen Strahlendosen ausgesetzt und anschließend die Auswirkungen auf die Spermatogenese untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein dosisabhängiger Zusammenhang besteht, bei dem es bei einer Radiatio über 4 Gray zu irreversiblen Schäden mit Beschädigung der Stammkeimzellen kommt [28].

Der Einfluss elektromagnetischer Felder, wie z.B. durch tragbare Telefone, wurde ebenfalls in den vergangenen Jahren häufig diskutiert. In der Studie von Yildirim et al., (2015) wurde beispielsweise eine Abnahme der Spermienmotilität nach ausgedehnter Handynutzung oder ständigem WLAN Gebrauch festgestellt [143]. Da die normalerweise in der menschlichen Umgebung vorkommenden Felder nur eine geringe Intensität von ca. 0,3 Millitesla besitzen, konnte ein Einfluss auf die Spermatogenese schlecht nachgewiesen werden [86]. Dennoch

erschien im Juli 2016 ein Review im Electronic Physician, in dem nach der Zusammenschau vieler Artikel vor dem Schaden elektromagnetischer Felder gewarnt wird. Es wurde beobachtet, dass es nicht nur zu einer Abnahme der Gonaden-Funktion, sondern auch zu einer Fehlfunktion der hormonellen Regelkreisläufe und zu Problemen während der Schwangerschaft kommen kann [6].

Auch anderen Umwelteinflüssen wird ein negativer Einfluss auf die Spermatogenese angelastet, dazu zählt Hitze [144] [113], aber auch Alkohol [93] und Rauchen [104]. So konnte sogar ein nachhaltig schlechter Einfluss des Tabakrauchs bei Neugeborenen rauchender Mütter nachgewiesen werden. Ramlau-Hansen et al., (2007) fanden heraus, dass Männer deren Mütter während der Schwangerschaft mehr als 19 Zigaretten pro Tag rauchten, eine um 38 % reduzierte Gesamtspermienzahl im Vergleich zur Normalbevölkerung aufweisen [99]. Ebenfalls Gegenstand neuerer Studien stellt der Zusammenhang zwischen einem erhöhten BMI und der Gonaden-Funktion dar [90]. Es wird davon ausgegangen, dass es nicht nur zur hormonellen Beeinflussung durch den erhöhten Östrogenspiegel bei Adipositas kommt, sondern auch zu einer direkten Wirkung auf die Spermatogenese, z.B. im Rahmen von DNA-Methylierung [30].

Die Psyche scheint auch einen wichtigen Einflussfaktor im Hinblick auf die Reproduktion zu besitzen. Dies berücksichtigt nicht nur den häufig assoziierten Verlust der Libido bei psychischen Erkrankungen, denn psychischer Stress führt auch zu einem hormonellen Ungleichgewicht und einer verminderten Spermienqualität [118].

Es sind noch viele weitere negative Einflussfaktoren, wie beispielsweise angeborene Entwicklungsstörungen oder Varikozele bekannt [87]. Auch das Alter spielt eine Rolle [90]. Denn selbst wenn bei Männern im Gegensatz zu Frauen die Fertilität weitestgehend erhalten bleibt, so kommt es doch zu einer höheren Rate von Aborten und Chromosomenanomalien mit steigendem Alter des Mannes [87].

2.4.3 Posttestikuläre Schäden

Zu den sogenannten „posttestikulären Angriffspunkten“, zählen Schädigungen, die erst nach dem Verlassen des Rete testis auf die Spermien einwirken. Es kann beispielsweise zu einer obstruktiven Azoospermie kommen, bei der es durch Verlegung des Ausflusstraktes zu einer „Blockade“ des Spermienflusses kommt. Es sind somit keine Spermien im Ejakulat nachweisbar. Im Vergleich zu einer nicht-obstruktiven Azoospermie ist diese meist gut operativ therapierbar, da die A-Spermatogonien intakt sind und zeitlebens neue Spermien

gebildet werden können [139]. Ein DNA-Schaden oder eine Beeinflussung der Spermatogenese liegt im Gegensatz zu Nicht-obstruktiver Azoospermie in diesem Fall nicht vor. Fukunaga et al., (2001) beschrieben, dass bei ICSI nach testikulärer Spermienextraktion bei Patienten mit nicht-obstruktiver Azoospermie signifikant weniger Schwangerschaften eintreten, als bei Patienten mit obstruktiver Azoospermie [43].

2.5 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung ist Fluch und Segen der heutigen Reproduktionsmedizin. Denn durch die Möglichkeiten der „Haltbarmachung“ von Spermien haben beispielsweise Patienten mit maligner Erkrankung (unabhängig von der Therapie) die Chance auf eigene Kinder. Allerdings bringt die Kryokonservierung auch Nachteile mit sich und es sind einige Studien bekannt, die ihren negativen Einfluss dokumentieren. Die Kryokonservierung führt nicht nur zu einer Reduktion der Motilität [64], sondern beeinflusst auch die Morphologie und die Chromatinstruktur der Spermien was zu erniedrigten Erfolgsraten von IVF und ICSI in der Reproduktionsmedizin führt [52]. Auch eine erhöhte Apoptose-Rate wurde beobachtet [105]. Die Kryokonservierung führt damit vor allem bei Patienten mit schlechter Spermienqualität zu einem prozentuell höheren Verlust von Spermien [53]. 2014 konnte das Deutsche IVF-Register zeigen, dass eine Schwangerschaft mittels IVF in 32,5 % der Fälle und mithilfe von ICSI in 31,7 % der Fälle eintrat. Nach Kryokonservierung und anschließendem Embryonentransfer lag die Erfolgsrate allerdings nur bei 25 % [32]. Agarwal et al., (2006) machten dafür unter anderem das erhöhte Auftreten von ROS in vitro im Gegensatz zu einer Befruchtung in vivo verantwortlich [2]. Nichtsdestotrotz sind auch Studien veröffentlicht worden, die trotz Kryokonservierung ähnlich gute Ergebnisse bei ICSI beschreiben, wie bei direkter Eizellenbefruchtung ohne vorheriges Einfrieren [43] [63].

Grund für die Schädigung der Spermatozoen während des Einfrierens ist die Bildung von Eiskristallen. Dieses Phänomen wurde bereits durch Meryman, (1956) beschrieben [77]. Er bemerkte, dass es bei zu schnellem Frieren zur Bildung intrazellulärer Eiskristalle kommt, die zu einer Schädigung der Zellmembran und Zellfunktion führen. In den vergangenen Jahren und Jahrzehnten wurden diverse Studien durchgeführt, bei denen unterschiedliche Verfahren getestet wurden. Einen wichtigen Fortschritt stellen hierbei die sogenannten Kryoprotektiva dar [23]. Durch den Einsatz hypertonen Flüssigkeiten als Gefriermittel kommt es zum osmotischen Ausstrom von intrazellulärem Wasser [88], was zum Schrumpfen der Zelle führt

und somit eine intrazelluläre Eiskristallbildung durch den verminderten Wasseranteil weitestgehend verhindert [117]. Zum anderen wird durch den höheren Anteil von Salzen und gelösten Substanzen in Kryoprotektiva der Gefrierpunkt erniedrigt und so der Zelle mehr Zeit verschafft die Flüssigkeit abzugeben [117].

Auch die Einfriergeschwindigkeit hat Einfluss auf das Outcome der Kryokonservierung. Hier unterscheidet man zwischen „slow-freezing“ und „rapid-freezing“. Beim langsamen Einfrieren kann ein möglichst schonender Ausstrom der Flüssigkeit in den Extrazellularraum gewährleistet werden und somit eine intrazelluläre Eiskristallbildung vermindert werden [53] [117].

Studien, bei denen die Spermien sehr schnell eingefroren wurden ergaben zunächst ebenfalls gute Ergebnisse mit kaum vorhandener intrazellulärer Eiskristallbildung [117][79]. Grund dafür ist jedoch meist die erhöhte Konzentration der Kryoprotektiva in den Gefrierlösungen, um eine ausreichende Dehydratation in kurzer Zeit zu erreichen [117]. Allerdings kommt es dadurch häufig während dem Auftauen zum sogenannten „osmotischen Schock“ und damit einhergehendem Zelltod [79].

Aktuell wird der Gebrauch von Gefriergeräten mit standardisierten „slow-freezing“ Programmen empfohlen und weitestgehend genutzt, da insbesondere bei Patienten mit schlechter Spermienqualität hier bessere Ergebnisse erzielt werden konnten [53].

2.6 Fragestellung

- I. Wie entwickeln sich folgende Parameter im Verlauf mehrerer Einfrier- und Auftauzyklen:
 - Gesamtspermienzahl (Spermatozoendichte, Volumen)
 - Motilität
 - Vitalität
 - Morphologie
 - nukleäre DNA
 - mitochondriale durch Caspase 3 vermittelte Apoptose
- II. Inwiefern bestehen Zusammenhänge im Verlauf der unter Punkt I. beschriebenen Parameter?
- III. Gibt es Einflussfaktoren auf die Resistenz der Spermien gegenüber dem Gefriervorgang?
(Alter, BMI, MAR)
- IV. Verläuft die Schädigung der Spermien mit jedem weiteren Gefrierzyklus linear oder exponentiell?

3 Material und Methoden

3.1 Probengewinnung und Aufbereitung

Im Zeitraum von Mai 2014 bis Januar 2015 wurden insgesamt 40 Spermien-Proben von freiwilligen Probanden gesammelt. Im Vorfeld wurden alle darauf hingewiesen, dass vor der Abgabe der Samenspende eine sexuelle Karez von drei Tagen eingehalten werden muss. Die Abgabe der Samenspende erfolgte durch Masturbation in einen sterilen Plastikbecher (siehe Abbildung 7) und fand direkt vor Ort in einem dafür vorgesehenen Raum der Reproduktionsmedizin in der Frauenklinik der Universität statt. So konnte gewährleistet werden, dass es weder zur zeitlichen Verzögerung der Aufbereitung, noch zu Temperaturschwankungen kam, die die Spermienqualität hätten beeinflussen können [138]. Zunächst wurden die Proben zur Liquefizierung für ca. 30 Minuten auf eine 37 bis 38 Grad (Celsius) warme Wärmplatte gestellt. Danach wurden sie in ein Kunststoffröhrchen (siehe Abbildung 7) mit ca. 15 ml Fassungsvermögen und Schraubverschluss überführt und mechanisch gemischt. Anschließend wurde die Beurteilung gemäß WHO-Richtlinien durchgeführt [138].



Abbildung 7
Plastikbecher und Kunststoffröhrchen

3.1.1 Alter und BMI

Die Probanden waren zwischen 20 und 44 Jahre alt und nur drei Probanden waren über 30 Jahre alt. Das Alter der Probanden war nicht normalverteilt, der Median lag bei 23 Jahren (siehe Tabelle 1 und Abbildung 8).

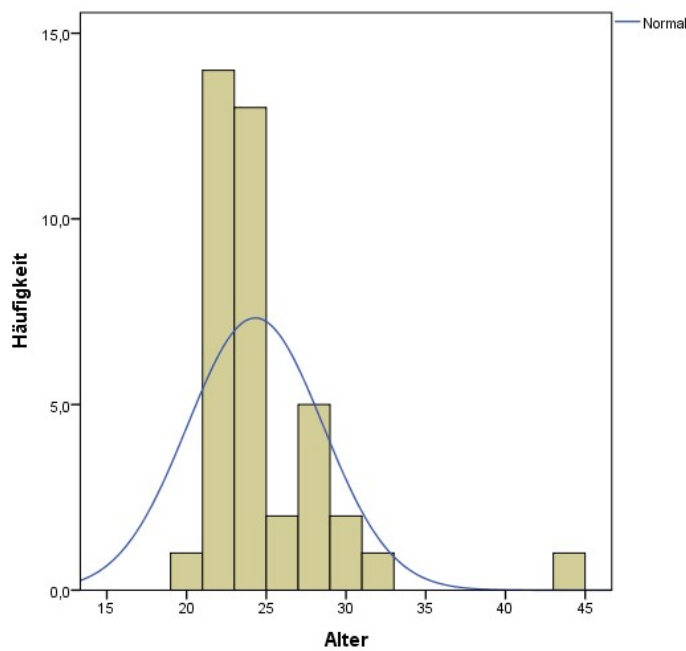


Abbildung 8
Altersverteilung der Probanden. Graphik erstellt bei SPSS.

Im Hinblick auf den BMI liegt keine Normalverteilung vor, der mediane BMI liegt bei 23,67 m^2/kg (siehe Tabelle 1 und Abbildung 9). Minimum stellt ein BMI von 18 m^2/kg dar, der maximale BMI liegt bei 33 m^2/kg . 65 % der Probanden (= 26 Studienteilnehmer) sind normalgewichtig und ihr BMI liegt im Bereich zwischen 20 bis 25 m^2/kg . Vier Probanden und damit 10 % sind leicht untergewichtig mit einem BMI kleiner 20 m^2/kg , wo hingegen acht Probanden (= 20 %) mit einem BMI zwischen 25 bis 30 m^2/kg als präadipös einzustufen sind und zwei Probanden (= 5 %) mit einem BMI größer als 30 m^2/kg adipös sind.

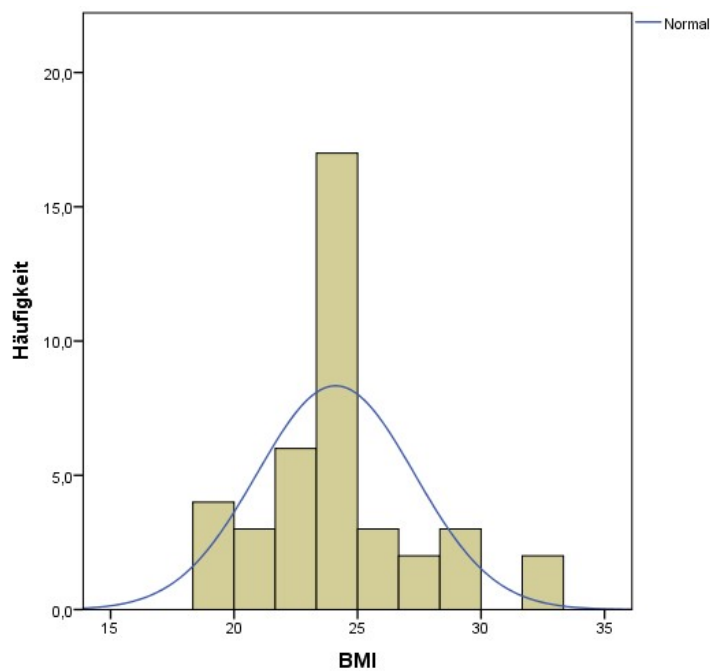


Abbildung 9
BMI der Probanden

3.2 Anfertigung von Ausstrichpräparaten

Für die später folgende Beurteilung der Apoptose, sowie für die Analyse der Morphologie mittels Papanicolaou (PAP) war die Anfertigung von Ausstrichpräparaten nötig. Dafür wurden nativ, sowie nach jedem Friervorgang (Zyklus 1 - 5) jeweils 10 Ausstriche erstellt. Es wurde auf jeden Objektträger (R. Langenbrinck, 76 x 26 mm, LOT 4205024) 20 µl der Spermienlösung pipettiert und anschließend mit einem anderen ebenfalls mit Spermienlösung eingedeckten Objektträger kurz zur Deckung gebracht, um eine gleichmäßige Verteilung der Spermienflüssigkeit auf der Oberfläche der Objektträger zu gewährleisten, bevor sie einzeln zur Trocknung an der Raumluft ausgelegt wurden.

Anschließend wurden die Ausstriche mit Mercofix Fixationsspray (Merck KGaA, Darmstadt, HC200027) fixiert und wiederum trocknen gelassen. Dann wurden die Objektträger in Objektträgerkästen einsortiert und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

3.3 Konventionelles Spermogramm

Die Beurteilung wurde standardisiert nach den aktuellen WHO-Richtlinien (Juni 2010) vorgenommen. Bei Anhang 1 findet sich ein Exemplar der verwendeten Spermogramm-Vorlage der Universität des Saarlandes mit den Normwerten.

3.3.1 Volumenanalyse

Nach der Liquefizierung und Überführung der Samenflüssigkeit in das Kunststoffröhrchen wurde das Volumen der jeweiligen Probe anhand der Eichstreifen abgelesen.

3.3.2 pH-Bestimmung

Die Bestimmung wurde nach der Liquefizierung, ungefähr 30 Minuten jedoch spätestens eine Stunde nach der Ejakulation durchgeführt, da der pH-Wert durch den Verlust von CO₂ an die Umgebung basischer werden kann [138].

Für die Ermittlung des pH-Wertes wurden 20 µl des Ejakulats auf ein spezielles Indikatorpapier (MColorpHast™, MerckKGaA, Darmstadt, HC437.134), wie in Abbildung 10 dargestellt, gegeben. Der Testbereich erstreckt sich von 6,5 bis 10,0 und das Ergebnis konnte nach ca. 30 Sekunden bei Vergleich des Indikatorpapiers mit der Kalibrierungsskala abgelesen werden.



Abbildung 10
pH-Teststreifen

3.3.3 Viskosität

Die Viskosität der jeweiligen Samenprobe wurde bei der Umfüllung der Samenflüssigkeit bestimmt. Nach Aspiration des Ejakulats mit einer Pipette und anschließendem „Fallen lassen“ des Tropfens, kann festgestellt werden, ob dieser der Schwerkraft folgend einfach

nach unten fällt, oder ob sich ein „Flüssigkeitsfaden“ bildet. Die Viskosität ist über die Norm erhöht, wenn sich der Faden länger als 2 cm zieht [138]. Bei sehr viskösem Ejakulat kann es zu Störungen der anderen Messergebnisse (z.B. Motilität, Spermatozoendichte, MAR) kommen [138].

Falls sich eine erhöhte Viskosität zeigte, konnte versucht werden dieser mithilfe von mechanischer Mischung des Ejakulats entgegen zu wirken und somit eine weitere Untersuchung zuzulassen.

3.3.4 Ermittlung der Gesamtspermienzahl und Spermatozoendichte

Für die Ermittlung der Spermatozoendichte, sowie der anderen folgenden Untersuchungen wurde das Durchlichtmikroskop Olympus CH2 verwendet.

Die Auswertung erfolgte mit einer Makler Kammer (Sefi-Medical Instruments 0,01 sq.mm, 10 µm deep), die in Abbildung 11 dargestellt ist. Dazu wurde jeweils ein 5 µl Tropfen des vorher mechanisch gemischten Ejakulats in die Vertiefung der Zählkammer gegeben, diese anschließend mit dem Deckglas verschlossen und unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung begutachtet. Zur Bestimmung der Spermatozoendichte in Millionen pro Milliliter wurden innerhalb des Zählkreuzes insgesamt dreimal 10 Quadranten ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Gesamtspermienzahl der jeweiligen Probe erhält man, indem die Spermatozoendichte mit dem vorher ermittelten Volumen multipliziert wird. Sie beschreibt die Anzahl aller Spermien, die der Proband in seiner abgegebenen Probe hat.



Abbildung 11
Makler-Zählkammer

3.3.5 Analyse der Motilität

Die Motilität wurde ebenfalls mithilfe der Makler-Kammer (Sefi-Medical Instruments 0,01sq.mm, 10µm deep) bestimmt. Parallel zur Bestimmung der Spermatozoendichte wurde die jeweilige Anzahl der global beweglichen, stationären und immotilen Spermien notiert. Aus diesen Werten wird zunächst ebenfalls ein Mittelwert gebildet und anschließend in Bezug auf die Spermatozoendichte der Anteil in Prozent ermittelt. Die Gesamtmotilität besteht aus global und stationär beweglichen Spermien und sollte über 40 % liegen [138].

3.3.6 Bestimmung der Vitalität

Für die Vitalität ist die Intaktheit der Zellmembran essentiell. Die Analyse erfolgte jeweils mit dem Durchlichtmikroskop Olympus CH2 bei 40-facher Vergrößerung und anhand folgender Tests:

3.3.6.1 Eosin-Test

Mithilfe des Eosin-Tests werden avitale Spermien detektiert. Eosin färbt den Hintergrund als auch die toten Spermien rot an, da die Farbe durch eine beschädigte Plasmamembran in die Spermien eindringen kann und somit zu einer Rotfärbung führt. Vitale Spermien haben dagegen eine intakte Plasmamembran und zeigen sich stattdessen weiß [138].

Für die Durchführung wurden 5 µl des Ejakulats und 5 µl des Eosins (Apotheke der Universität des Saarlandes) auf einen Objektträger gegeben, mit der Pipettenspitze vermennt und anschließend mit einem Deckglas abgedeckt. Dies wird in doppelter Ausfertigung vorbereitet. Anschließend werden viermal insgesamt 100 Spermien ausgezählt und der Anteil der vitalen, bzw. avitalen Spermien ermittelt. Die verwendeten Untersuchungsmaterialien sind in Abbildung 12 dargestellt.



Abbildung 12
Eosin im linken Bildrand, Objektträger und Pipette

3.3.6.2 Hypoosmolarer Schwelltest (HOS)

Auch bei dem hypoosmolaren Schwelltest (HOS) wird die Integrität der Plasmamembran überprüft. Bei vitalen Spermien ist die Membran semipermeabel, was dazu führt, dass es nach Zugabe hypoosmolarer Lösung zu einem Hydrops kommt. Avitale Spermien besitzen keine solche Plasmamembran und zeigen sich nach Zugabe der hypoosmolaren Lösung unverändert.

Zunächst wurde die Schwelllösung hergestellt. Dazu wurden 0,735 g Natriumzitatdihydrat und 1,351 g D-Fruktose in 100 ml destilliertem Wasser aufgelöst und im Anschluss in 1 ml - Portionen bei -20 °C in Eppendorfgefäßen eingefroren. Bei Testdurchführung wurden 100 µl des Ejakulats zu 1 ml aufgetauter Schwelllösung überführt, die Lösung gemischt und 30 - 90 Minuten auf der Wärmeplatte belassen. Anschließend erfolgte die Auswertung bei 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop Olympus CH2. Es wurden 10 µl der Lösung auf einen Objektträger gegeben, mit Deckglas bedeckt und zweimal 100 Spermien anhand von Abbildung 13 ausgewertet. Anschließend wurde der Mittelwert gebildet.

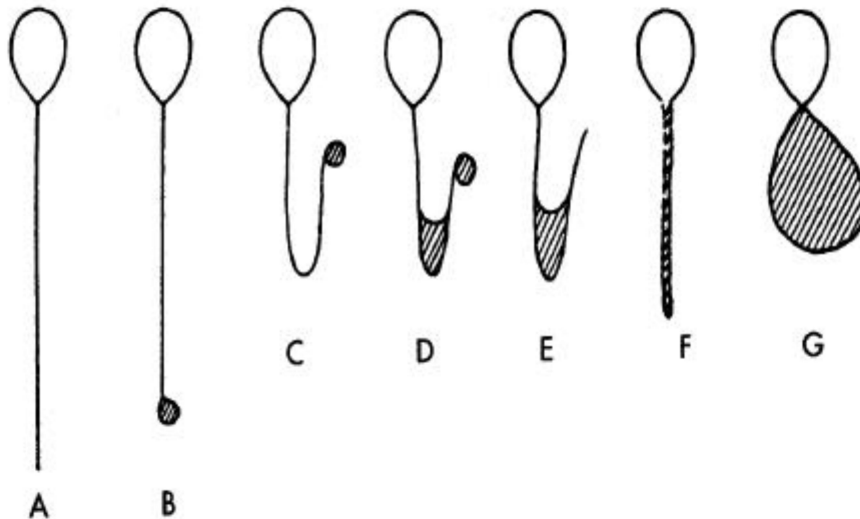


Abbildung 13

Mögliche morphologische Veränderungen, die durch den Einfluss der hypoosmotischen Lösung auftreten können. Die schraffierten Bereiche entsprechen den Schwellungen des Spermatozoenschwanzes. Das links dargestellte Spermium zeigt keine Schwellung, es ist somit vom Verlust der Membranintegrität auszugehen.

Van der Ven H, Perez-Pelaez M, Crabo B, LJD Z (1984) Reproduced from Jeyendran RS. J [132], Edition F (2010) Examination and processing of human semen. World Health Edition [138]

3.3.7 Analyse der Morphologie

Es gibt unterschiedliche Arten der Malformation von Spermien. Ein Anteil normal-geformter Spermien von über 25 % ist sehr selten, die untere Referenzgrenze liegt bei 3 - 4 % [138]. Darunter spricht man von einer Teratozoospermie, die aufgrund der Vielzahl an amorphen Spermien mit einem erhöhten Maß an Infertilität einhergehen kann.

3.3.7.1 Färbung durch Papanicolaou (PAP)

Für die Beurteilung der Morphologie mussten die Spermien zunächst gefärbt werden. Hierfür wurde die Färbung nach Papanicolaou mithilfe des Färbeautomat „Varistain“ 24-4 der Firma Shandon durchgeführt. Der Färbeautomat färbt die Präparate automatisch nach einem fest vorgegebenen Zeitschema das in Abbildung 14 dargestellt ist. Die Färbelösungen werden vor Gebrauch filtriert.

1.	80% Ethanol, vergällt	2 min
2.	80% Ethanol, vergällt	2 min
3.	Aqua dest.	2 min
4.	Hämatoxylin nach Gill II	1 ½ min
5.	Leitungswasser fließend	1 min
6.	Leitungswasser fließend	1 min
7.	Clarifier	25 sec
8.	Aqua dest.	2 min
9.	50 % Ethanol, vergällt	1 min
10.	80 % Ethanol, vergällt	1 min
11.	90% Ethanol, vergällt	1 min
12.	Orange II Lösung (Pap. Lösung 2 b)	30 sec
13.	Absoluter Ethanol, vergällt	1 min
14.	Absoluter Ethanol, vergällt	1 min
15.	Absoluter Ethanol, vergällt	1 min
16.	Polychromlösung EA 50 (Pap. Lösung 3 b)	2 ½ min
17.	Absoluter Ethanol, vergällt	1 min
18.	Absoluter Ethanol, vergällt	1 min
19.	Absoluter Ethanol, vergällt	1 min
20.	Absoluter Ethanol, vergällt	1 min
21.	Xylol	1 min
22.	Xylol	1 min
23.	Xylol	1 min
24.	Xylol	1 min

Abbildung 14

[Quelle: Färbervorschrift aus der Frauenklinik der Universitätsklinik des Saarlandes]

Im Anschluss wurden die noch feuchten Objektträger mit Entelan eingedeckt und mit einem Deckglas versiegelt.

Für die Auswertung wurde das Mikroskop Olympus CX41 zusammen mit dem Computerprogramm medeaLAB CASA von MTG verwendet. Das medeaLAB CASA System kann standardisiert für die Spermienanalyse genutzt werden und wurde auf WHO Standards abgestimmt. Für die Auswertung der Morphologie wurde der medeaLAB Morphology Analyser mit 40-facher Vergrößerung benutzt. Dieser berechnet die exakte Morphometrie für jedes einzelne Spermium und ermittelt den Anteil normaler, sowie abnormal geformter Spermien, wie in Abbildung 15 zu sehen. Hierbei wird nochmal unterschieden in Anomalien des Spermienkopfes, des Mittelstücks, des Spermischwanzes sowie Kombinationen (Anomalie von Kopf + Mittelstück, Kopf + Schwanz, Mittelstück + Schwanz, Kopf + Mittelstück + Schwanz).

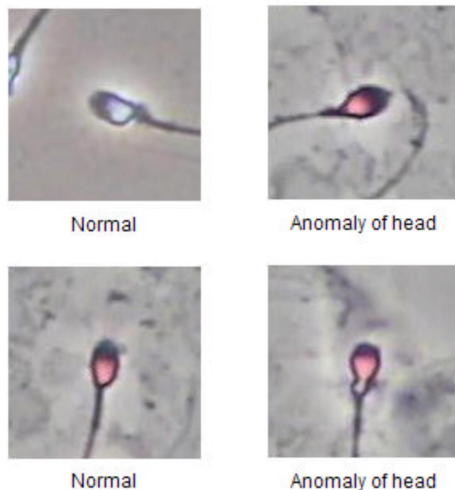


Abbildung 15

Auswertung durch den medeaLAB Morphology Analyzer. Er berechnet automatisch die Größe des Spermienkopfes, sowie die Form und ermittelt ob dieses mit den WHO-Grenzwerten kompatibel ist. medeaLAB Morphology Analyser Version 1.2, April 2010, User Manual, page 7 [75]

Es gelten die von der WHO vorgegebenen Standards : [138]

(siehe auch Abbildung 16)

- Kopf:

Der Spermienkopf soll glatt begrenzt, regelmäßig und oval geformt sein (ca. 4,1 μm Länge und 2,8 μm Durchmesser). Die akrosomale Region sollte gut definiert sein und 40 – 70 % des Kopfes umschließen. Es sollen im Kopf keine großen Vakuolen vorkommen und maximal zwei kleine Vakuolen, die insgesamt nicht mehr als 20 % des Spermienkopfes einnehmen sollen. Es sollen sich keine Vakuolen in der post-akrosomalen Region befinden.

Zu große oder zu kleine Köpfe, so wie birnenförmige, amorphe oder aplastische Köpfe gelten als Anomalie. Auch Spermien ohne Akrosom und Spermien mit zwei Köpfen gelten als anomal.

- Mittelstück:

Das Mittelstück soll schlank und gleichmäßig sein (ca. 4,0 μm Länge und 0,6 μm Durchmesser). Es soll insgesamt in etwa die gleiche Länge wie der Spermienkopf besitzen und mit ihm auf einer Achse liegen

Das Mittelstück gilt als anomal, wenn es asymmetrisch in den Spermienkopf einmündet, zu dick oder unregelmäßig geformt ist.

- Schwanz:

Der Spermischwanz soll einen gleichmäßigen Durchmesser aufweisen und sich dünner als das Mittelstück darstellen. Des Weiteren soll er keine scharfen Kanten oder Brüche haben.

Ist der Schwanz gebrochen, zu kurz, mit scharfen Kanten versehen, oder unregelmäßig im Durchmesser, gilt er als anomal. Außerdem zählen das Auftreten von mehreren Schwänzen, sowie stark gebogene, oder aufgerollte Schwänze als pathologisch.

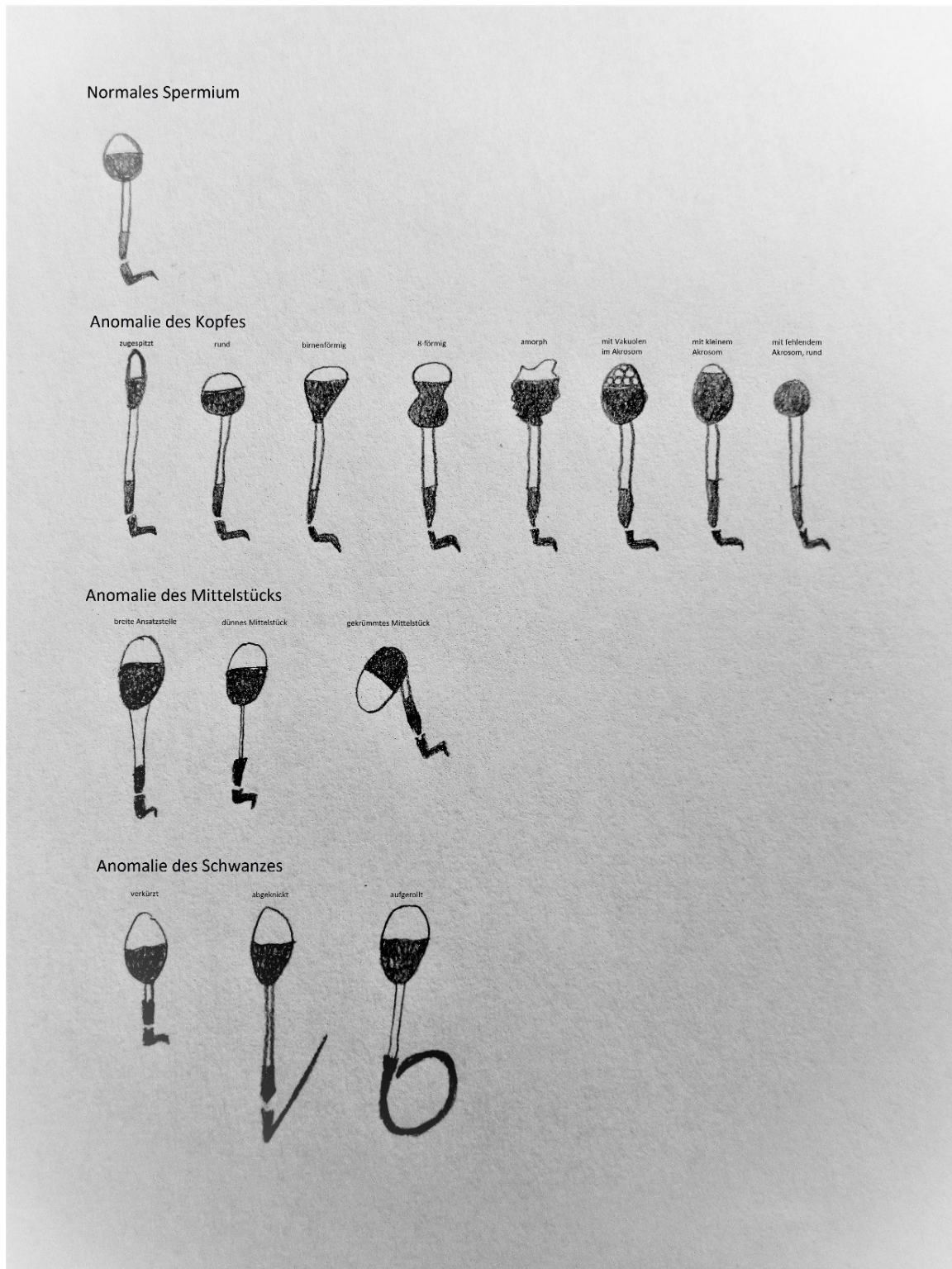


Abbildung 16

Zu erkennen sind ein normales Spermium, sowie mögliche Anomalitäten der Morphologie an Kopf, Mittelstück und Schwanz der Spermien
[Zeichnung von Carolin Müller]

3.3.8 Leukozytenbestimmung mittels Peroxidase

Die Anzahl der Leukozyten im Ejakulat wurde mit dem Peroxidase-Test nachgewiesen. Da vor allem Granulozyten die Peroxidase exprimieren und sie gleichzeitig die größte Gruppe der Leukozyten im Ejakulat darstellen, werden hauptsächlich diese bei der Reaktion nachgewiesen. Sie färben sich leicht braun, beziehungsweise bläulich. Davon abzugrenzen sind die sogenannten Rundzellen (= nicht entwickelte Spermien). Diese sehen morphologisch sehr ähnlich aus, färben sich bei der Reaktion aber nicht, oder nur leicht pink an. [138] Auch die Kerngröße der Zellen kann gegebenenfalls bei der Unterscheidung helfen. Es ist zu beachten, dass die Leukozyten hier eine große Varianz zeigen können. Lymphozyten haben einen Durchmesser von ca. 7 μm , wohingegen der Durchmesser von Makrophagen bei 15 μm liegen kann [138].

Zunächst wurde eine Stammlösung angefertigt. Hierzu wurden 150 μl Ortho-Toluidin (o-Toluidine, Merck KGaA, Darmstadt, Index-N.: 612-091-00-X) in einen 100 ml Kolben gegeben und bis zum 100 ml- Eichstrich mit 0,9 % NaCl (B.Braun Melsungen AG, 190|12606084|0812) aufgefüllt. Die Lösung wurde mit einem Magnetfisch gut gemischt und war für einen Monat im Kühlschrank stabil. Aus der Stammlösung wurden für den täglichen Gebrauch 5,0 ml entnommen und mit 10 μl 1,5 % Wasserstoffperoxid (Apotheke der Universität des Saarlandes) vermengt. Diese sogenannte Gebrauchslösung ist für 24 Stunden im Kühlschrank stabil.

Zur Durchführung des Tests wurden 180 μl der Gebrauchslösung entnommen, mit 20 μl des Ejakulats gut vermischt und die Lösung für ca. 20 Minuten auf der Wärmeplatte inkubiert. Anschließend wurden 6,5 μl der Lösung auf das Zählkreuz der Neubauer-Zählkammer (0,100 mm Tiefe / 0,0025 mm²) gegeben. Die Zählkammer ist in Abbildung 17 zu sehen.

Es wurde mithilfe des Durchlichtmikroskops Olympus CH2 bei 40-facher Vergrößerung die Anzahl der Peroxidase-positiven Zellen im gesamten Zählkreuz (d. h. in allen 25 Quadraten) bestimmt. Diese Anzahl wurde durch 10 dividiert und entspricht dann der Zahl Millionen Leukozyten pro Milliliter (= x Mill. Leukozyten / ml). Referenzwerte für die Anzahl Peroxidase-positiver Zellen variieren sehr stark; je nach Quelle von 0,5 – 2 x 10⁶ Leukozyten / ml [138].



Abbildung 17
Neubauer-Zählkammer

3.3.9 Mixed Antiglobulin Reaction - Test (MAR)

Mit dem Mixed Antiglobulin Reaction – Test werden Antikörper nachgewiesen, die sich auf der Oberfläche der Spermien befinden können. Dadurch kann es unter den Spermien zu Agglutination kommen, die somit zu einer verminderten Fortbewegungsfähigkeit führt. Der Kit (SpermMar Test IgG) wird im Kühlschrank aufbewahrt und besteht aus zwei Lösungen, die in Abbildung 18 dargestellt sind.

Zur Testdurchführung wurden zunächst 5 µl des Ejakulats auf einen Objektträger gegeben und mit 5 µl der ersten Lösung (weiß: REF SPMG_L / LOT: FP14G09), dem SpermMar Latex Partikel versetzt. Die Polystyren-Latex-Teilchen sind mit humanem Immunglobulin G (IgG) beschichtet. Anschließend wurden 5 µl des SpermMar Antiserum (blau: REF SPMG_A / LOT: FP14G09) dazugegeben, wessen monospezifisches Antiserum sich gegen das Fc-Fragment von humanem IgG richtet und gleichzeitig an die Antikörper der Latex Partikel bindet. Somit kommt es bei vorhandenen Antikörpern auf der Spermienoberfläche zur Ausbildung von sogenannten Agglutinen. Die gebundenen Spermien kleben an den Latexpartikeln fest und können sich nicht mehr lösen. Im Gegensatz dazu bewegen sich die Spermien ohne Antikörper auf der Oberfläche frei über den Objektträger.

Mit dem Durchlichtmikroskop Olympus CH2 wurden bei 40-facher Vergrößerung insgesamt zweimal 100 Spermien ausgezählt. Die erste Zählung erfolgte nach 3 Minuten, eine weitere nach 10 Minuten. Normalerweise wird der zweite Wert notiert, es sei denn, es finden sich keine motilen Spermien auf dem Objektträger. Dann wird die erste Zählung übernommen.

Sobald mehr als 50 % der Spermien mit Antikörpern gebunden sind, ist von einer verminderten Fertilität auszugehen [138]. Die WHO weist allerdings darauf hin, dass es auch

zur Agglutination ohne bestehende Antikörper kommen kann und theoretisch eine Agglutination auch bei bestehenden Antikörpern ausbleiben kann [138].



Abbildung 18
MAR-Testreagenzien

3.3.10 Ermittlung allgemeiner Patientendaten

Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben zu garantieren wurde von jedem Probanden Geburtsdatum, sowie Körpergröße und Körpergewicht ermittelt (siehe auch Punkt 3.1.1). Außerdem wurden nur Probanden ausgewählt, die keine gesundheitlichen Probleme aufwiesen und nicht regelmäßig Medikamente einnahmen.

3.4 Apoptosebeurteilung

Durch natürliche Umwelteinflüsse, aber auch durch künstlich herbeigeführte, wie zum Beispiel mechanische Schädigung oder (wie im Falle dieser Doktorarbeit) durch Temperaturschwankungen, kommt es zum Absterben von Spermien. Um zu überprüfen inwiefern es dabei auch zu Schädigungen der DNA kommt, wurden folgende Tests durchgeführt:

3.4.1 Nukleäre DNA

Die nukleäre DNA befindet sich im Zellkern, welcher im Falle der Spermien im Spermienkopf lokalisiert ist. Sie ist Träger des genetischen Codes und besteht zu gleichen Anteilen (50 %) aus väterlichen und mütterlichen Anteilen.

3.4.1.1 TUNEL

Bei der Apoptose entstandene Einzel- und Doppelstrangbrüche der nukleären DNA können mithilfe des TUNEL (terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling-) Tests detektiert werden. Es wurde bei der folgenden Methode der „Roche, InSitu Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Mannheim)“ verwendet (REF: 11 684 795 910, LOT 10770900).

Hierbei bindet über eine enzymatische Reaktion ein Fluoreszenzfarbstoff an das freie 3'OH-Ende der Strangbrüche. Dies wird im Anschluss mithilfe des Mikroskops Olympus BX61 detektiert.

Für die bessere Übersicht wird die Durchführung nummeriert aufgeführt:

- I. Zunächst wurden die vorgefertigten Objektträgerausstriche für zwei Stunden in Fixationslösung inkubiert. Als Fixationslösung wurden 4 % - Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4 (Morphisto, REF 11762.01000) verwendet.
Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS (Sigma(-Aldrich) „phosphate buffered saline“, LOT#SLBL0082V; 1 Tablette auf 200 ml destilliertes Wasser) gespült.
- II. Als Permeabilisierungslösung wurde 0,1 % Triton™ X-100 (Sigma(-Aldrich), T8787-50ml, LOT#MKBR5267V) in 0,1 % Natriumcitrat-Lösung (Apotheke der Universität des Saarlandes) mit pH 6,0 verwendet. In dieser Lösung wurden die Objektträger für weitere 15 Minuten inkubiert.
Die Objektträger wurden danach dreimal mit PBS gespült, die Rückfläche der Objektträger abgetrocknet und die Objektträger zur Trocknung aufgestellt.
- III. Der nächste Schritt musste unter Lichtausschluss im Dunkeln stattfinden. Jeder Objektträger wurde hierbei mit 25 µl der TdT-labeled nucleotid mixture eingedeckt und anschließend mit einem Deckglas (24 x 60 mm) bedeckt. Für 20 Objektträger wurden vorher die im Kit vorhandenen 50 µl Enzyme Solution und 450 µl der Label Solution vermengt, so erhielt man das geforderte Mischungsverhältnis von 1:10.
Die Objektträger wurden in eine feuchte Kammer gelegt, die zur Hälfte mit heißem Wasser gefüllt ist und anschließend über Nacht zur Inkubation bei 37°C im Dunkeln gelagert.

- IV. Für die Durchführung einer Negativ-Kontrolle wurde kein Enzym zugegeben, sondern die Objektträger nur mit Label Solution eingedeckt. Ansonsten wurden alle genannten Schritte normal durchgeführt.

Die Positiv-Kontrolle konnte mithilfe der DNase durchgeführt werden. Die DNase soll hierbei eine Konzentration von 3U pro 1 ml haben und die Objektträger wurden nach der Fixierung (vor der Permeabilisierung) damit bedeckt und gewartet, bis die Flüssigkeit getrocknet ist. Anschließend wurden alle Schritte normal weiter befolgt.

- V. Am nächsten Tag wurden die Objektträger erneut zweimal mit PBS gespült und kurz getrocknet. Falls die Auswertung erst später erfolgte, konnten die getrockneten Objektträger für einige Tage unter Lichtausschluss im Kühlschrank gelagert werden.

Kurz vor der Auswertung wurden die Proben noch mit DAPI (= 4',6-Diamidino-2-phenylindol, Sigma(-Aldrich), LOT# BCBJ1112V) eingedeckt. Dieses soll eine Konzentration von 5 µg pro 1 ml aufweisen; es wurden auf jeden Objektträger 25 µl der Flüssigkeit gegeben und anschließend mit einem Deckglas bedeckt.

- VI. Pro Objektträger wurden 100 bis 200 Spermien ausgewertet und anschließend ein Wert in Prozent (%) ermittelt.

Die hell grün fluoreszierenden Spermien sind Tunel positiv, d.h. sie befinden sich in Apoptose und haben dementsprechend eine schlechte Chromatin-Kondensation (siehe auch Abbildung 19). Die nicht-fluoreszierenden Spermien sind Tunel negativ und besitzen demnach eine gute Chromatin-Kondensation.

Für die Auswertung wurde das Mikroskop Olympus BX61 mit dem 40er Objektiv (Olympus UPlanFI 40x/ 0.75Ph2) verwendet. Dabei wurden zwei verschiedene Filter benutzt: Zum einen ein normales FITC-Filterset (Anregung max. 500 nm, Splitter 515 nm, Detektion 535 nm) und zum anderen ein Cy3-Filterset (Anregung max. 535 nm, Splitter 565 nm, Detektion 610 nm). Des Weiteren wurde zum Sichtbarmachen der unterschiedlichen Absorption das Programm ISIS am angeschlossenen Computer zur Auswertung herangezogen.

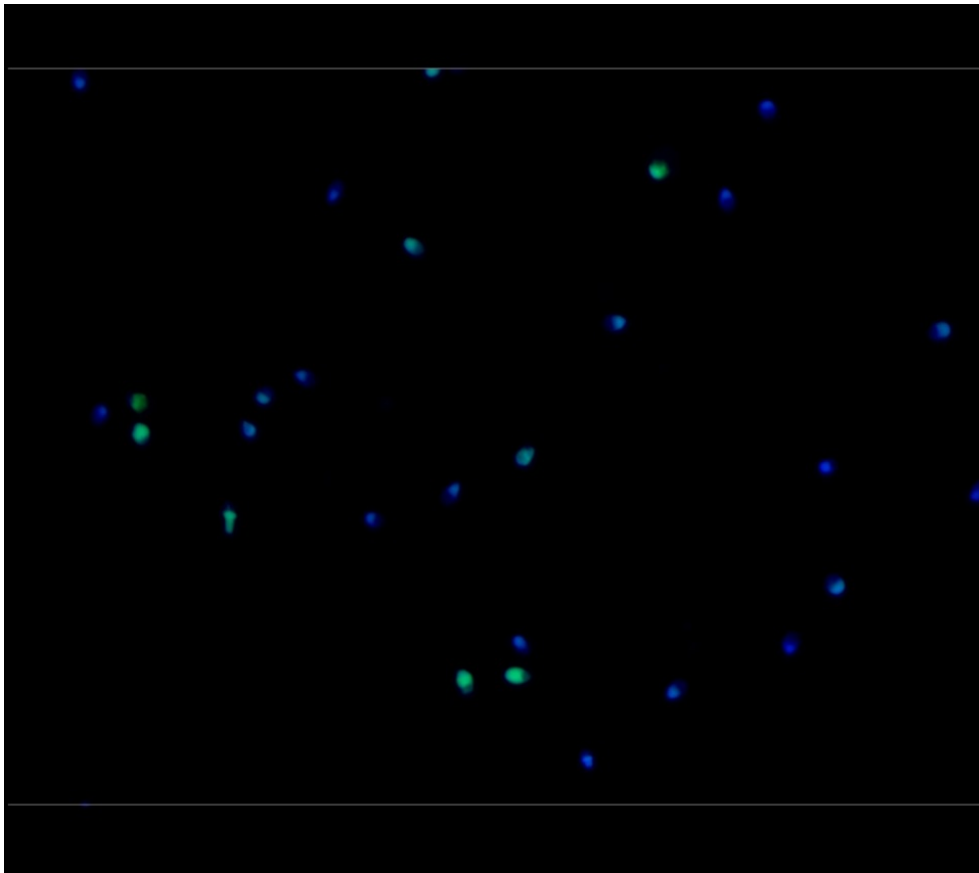


Abbildung 19

Zu erkennen sind die grün-leuchtenden TUNEL-positiven Spermien, sowie nicht leuchtende, im Bild blau erscheinende, intakte Spermien. [Bild: Carolin Müller; CM34, Z3; 07.05.2015]

3.4.2 Mitochondriale DNA

Die Mitochondriale DNA befindet sich in den Mitochondrien- diese sind die Energie erzeugenden Zellorganellen. Sie ist unabhängig von der nukleären DNA und hat einen eigenen genetischen Code (siehe auch Kapitel 2.2.2).

3.4.2.1 Caspase 3

Der Caspase 3 - Test (Antibody to Active Caspase 3 FITC Detection Kit; Catalog#FAB200-2, Part#5001Test Size 100, Lot#KA40510) weist ebenfalls sich in Apoptose befindliche Zellen nach.

Nach dem Prinzip der indirekten Immunhistochemie werden zunächst durch einen primären Antikörper die Aminosäuren 163 - 175 der Caspase 3 gebunden. Anschließend wird ein sekundärer Antikörper zugegeben, der den ersten Antikörper bindet und gleichzeitig mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Dieser kann wiederum mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen werden.

Für die bessere Übersicht soll die Durchführung des Tests nummeriert dargestellt werden:

I. Vorbereitung

- Working Dilution des Rabbit Anti Active Caspase 3:

In einem Glasfläschchen des Kits waren 55 µl des Antikörpers. Um eine Verdünnung der Working Dilution von 1:20 zu erreichen, wurden 1045 µl PBS + 2 % BSA (Bovines Serum Albumin (Sigma), A-2153/50g/Lot20K0908) dazugegeben. Die Lösung wurde in 50 µl Portionen in Eppendorfgefäßen eingefroren.

[PBS + 2 % BSA = 2 ml BSA + 98 ml PBS]

- Working Dilution des Secondary Antibody: FITC oder PE Labeled Goat Anti Rabbit:

Die Verdünnung des sekundären Antikörpers muss unbedingt unter Lichtausschluss im Dunkeln erfolgen. Für die Arbeitskonzentration des Antikörpers wurde eine 1:10 Verdünnung mit PBS + 2% BSA hergestellt. Hierfür wurden zu den 110 µl des im Kit vorhandenen Antikörpers zusätzlich 990 µl PBS + 2 % BSA zugegeben. Die hergestellte Working Dilution wurde wieder in 50 µl Portionen in Eppendorfgefäßen portioniert und war für eine Woche bei 4°C im Kühlschrank oder alternativ für sechs Monate bei -20°C stabil.

- Working Dilution of Fixative Solution:

Die Fixative Solution musste für die Verwendung mit PBS (Sigma(-Aldrich) „phosphate buffered saline“, LOT#SLBL0082V; 1 Tablette auf 200ml destilliertes Wasser) 1:10 verdünnt werden. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

II. Vorbereitung unmittelbar vor der Färbung

- Working Dilution des Rabbit Anti Active Caspase 3:

Verdünnung des Antikörpers 1:20 mit PBS + 2 % BSA (Bovines Serum Albumin (Sigma), A-2153/50g/Lot20K0908) Puffer. Das heißt 50 µl des Antikörpers wurden mit 950 µl PBS + 2 % BSA vermischt. Anschließend wurden 10 µl Ziegsenserum (Goat Serum, Dako Cytomation, REF:X0907/10ml/Lot#00023893) für die Reduktion der Hintergrundfärbung zugegeben.

- Working Dilution des Sekundären FITC-markierten Antikörpers:

Wichtig ist hier wieder das Arbeiten unter Lichtausschluss. Zu den 50 µl des sekundären Antikörpers wurden 950 µl des PBS + 2 % BSA (Bovines Serum Albumin (Sigma), A-2153/50g/Lot20K0908) Puffers gegeben. Das entspricht einer Verdünnung von 1:20 und auch zu dieser Mischung wurden 10 µl Ziegenserum (Goat Serum, Dako Cytomation, REF:X0907/10ml/Lot#00023893) zugegeben, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren.

III. Durchführung

- Die Objektträger wurden mit je 50 µl der 1:10 verdünnten Fixative Solution eingedeckt, mit Deckglas versehen und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.
- Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal für je 5 Minuten in jeweils frischer PBS + 0,1 % Triton™ X-100 (Sigma(-Aldrich), T8787-50ml, LOT#MKBR5267V) – Lösung gewaschen.

[PBS + 0,1 % Triton = 500 ml PBS → davon werden 500 µl verworfen und anschließend 500 µl Triton zugegeben]

- Anschließend wurden die Objektträger mit der 1:20-fach verdünnten Working Dilution des Anti-Caspase-3-Antikörpers aus Kaninchenserum für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Objektträger wurden 50 µl der Solution verwendet, so dass mit den ursprünglich vorbereiteten 1000 µl insgesamt 20 Objektträger gefärbt werden konnten. Die Objektträger wurden mit Deckgläsern bedeckt und für die Inkubation in eine feuchte Kammer gelegt.

- Die Objektträger wurden dreimal für je 10 Minuten in jeweils frischer PBS + 1 % Triton™ X-100 (Sigma(-Aldrich), T8787-50ml, LOT#MKBR5267V) gewaschen.

[PBS + 1 % Triton = 495 ml PBS + 5 ml Triton]

- Danach wurden die Objektträger im Dunkeln mit der 1:20-fach verdünnten Working Dilution des sekundären FITC-markierten Antikörpers für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Objektträger wurden 50 µl des Antikörpers verwendet, anschließend wieder mit Deckglas abgedeckt und in eine feuchte Kammer gelegt.

- Nach der Inkubation wurden die Objektträger dreimal kurz mit PBS + 0,1 % Triton™ X-100 (Sigma(-Aldrich), T8787-50ml, LOT#MKBR5267V) gewaschen.

[PBS + 0,1 % Triton = 500 ml PBS → davon werden 500 µl verworfen und anschließend 500 µl Triton zugegeben]

- Die Objektträger können bis zur Auswertung einige Tage unter Lichtausschluss im Kühlschrank (4°C) gelagert werden. Vor der Auswertung sollten die Objektträger mit 50 µl eines Antifades zur Vermeidung von Verblässung eingedeckt und mit einem Deckglas bedeckt werden.

[Antifade: 9 ml Glycerol + 1 ml trisCl + 0,05 g h-propylgallat für 10 - 15 Minuten bei 60°C erwärmen und anschließend bei -22°C aufbewahren]

IV. Auswertung

Die Objektträger wurden mithilfe des Mikroskops Olympus BX61 mit dem 40er Objektiv (Olympus UPlanFI 40x/ 0.75Ph2) ausgewertet. Dabei wurde ein normales FITC-Filterset (Anregung max. 500 nm, Splitter 515 nm, Detektion 535 nm) verwendet und die Ergebnisse im Programm ISIS auf dem Computer nachgewiesen.

Durch die Bindung des FITC-Antikörpers an die vorher mit Antikörper markierte Caspase 3 konnten die sich in Apoptose befindenden Spermien detektiert werden und erscheinen hell grün fluoreszierend (siehe Abbildung 20). Es wurden pro Objektträger 100 bis 200 Spermien ausgezählt und anschließend ein Anteil in Prozent (%) errechnet.

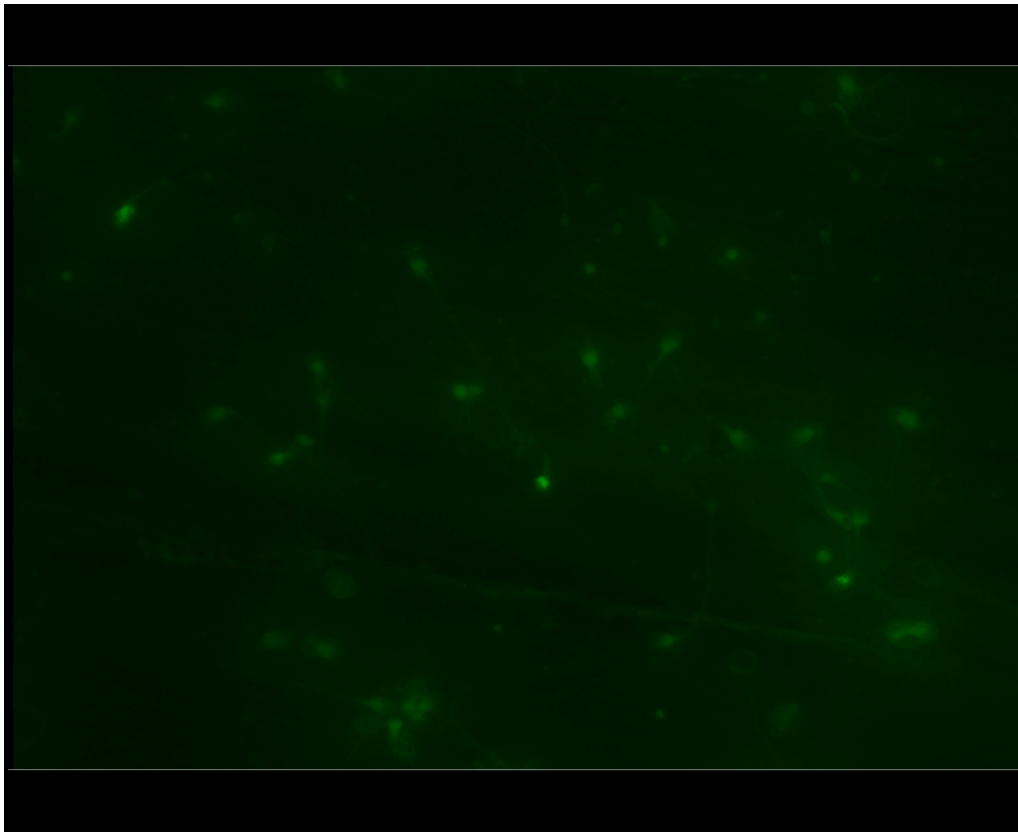


Abbildung 20

Zu erkennen sind nicht leuchtende Spermien, sowie hell grün leuchtende, Caspase 3 exprimierende Spermien. [Bild: Carolin Müller; CM3, Z3; 28.05.2015]

3.5 Kryokonservierung

Durch die Kryokonservierung kann eine längere Aufbewahrung der Spermien erfolgen, allerdings ist zu beachten, dass es dadurch auch zu Schäden an den Spermien kommen kann (siehe Kapitel 2.5).

Insgesamt wurden alle Proben insgesamt fünfmal eingefroren und fünfmal aufgetaut. Zwischen jedem Einfrier- und Auftauzyklus wurden die oben genannten Versuche durchgeführt, bzw. für die Durchführung Objektträger vorbereitet.

3.5.1 Gefriervorgang

Nachdem die oben aufgeführten Versuche abgeschlossen waren, wurden die Proben für die Kryokonservierung vorbereitet. Dazu wurde das Ejakulat mit einer Gefrierlösung (= Kryokonservierungslösung) im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend mithilfe einer Spritze in die in Abbildung 21 dargestellten, ca. 25 µl fassenden Straws (PP-Test tubes, Cellstar, Greiner, Bio-One, GmbH, Frickenhausen) überführt. Diese Röhrchen wurden dann

mit kleinen Plastikkugeln verschlossen und in Klarsichtkassetten (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) einsortiert.

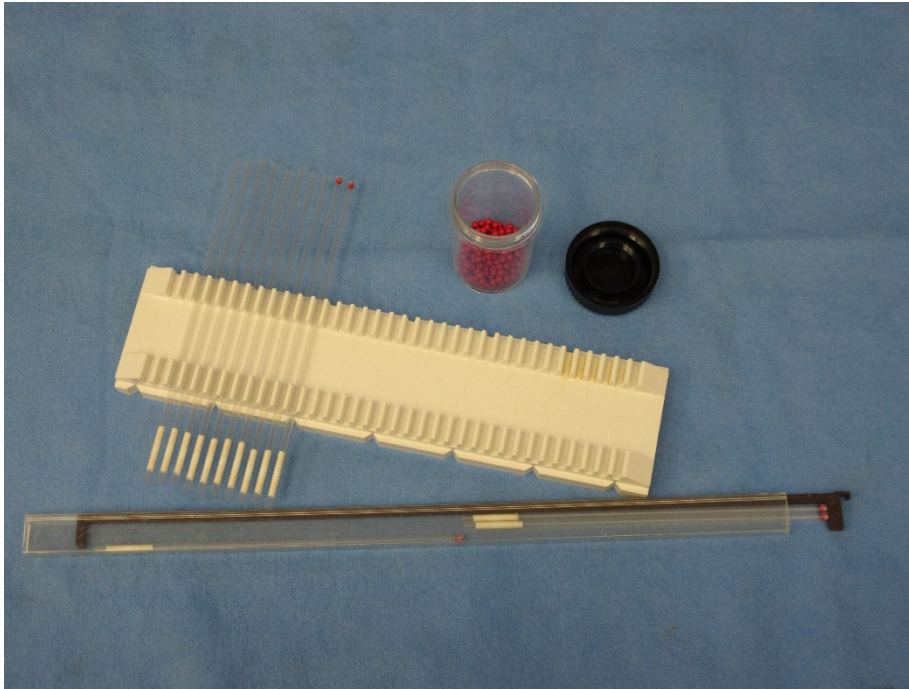


Abbildung 21
Straws, Verschlusskugeln und Kassette zum Einfrieren

Die Kassetten wurden beschriftet und konnten dann in die Gefriermaschine (Planer, KRYO 10, Series III) überführt werden (siehe Abbildung 22). Im Anschluss wurde mittels Gefriermaschine die Kryokonservierung der Spermien vorgenommen. Das Programm zum Einfrieren von Ejakulat dauert ungefähr 45 Minuten. Danach wurden die Klarsichtkassetten mit den darin enthaltenen Proben in einer mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tonne aufbewahrt.



Abbildung 22
Gefriermaschine KRYO 10

3.5.2 Auftauen

Für das Auftauen der Proben wurde zunächst ein großer Styropor-Behälter mit flüssigem Stickstoff gefüllt und die Proben direkt dort hineingelegt. Die Klarsichtkassetten wurden im Stickstoff geöffnet. Es wurde ein Straw mithilfe einer Pinzette entnommen und in ein Wärmebad gehalten.

Nach Verflüssigung des Ejakulats wurde mit einer Schere das obere Ende des Straws aufgeschnitten und der Inhalt aller Straws eines Probanden wieder in ein Kunststoffröhrchen zur weiteren Analyse überführt.

3.6 Standardlösungen

3.6.1 Herstellung PBS

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	1,42 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	0,27 g

Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen und gut mischen.

3.6.2 Gefrierlösung

Lösung I:

NaCl	2,9 g
KCl	0,2 g
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
Na-Laktat	1,44 g = 1,15 ml
Na-Dihydrogenphosphat	0,025 g
Na-Hydrogencarbonat	1,3 g
Hepes	2,383 g

Alles in 100 ml destilliertem Wasser lösen. Die Lösung ist bei - 20°C für mindestens 3 Monate haltbar.

Lösung II:

Saccharose	1,711 g
Glucose	0,0059 g

Beides zusammen in 57,46 ml destilliertem Wasser lösen.

Es werden 20 ml von Lösung I zu Lösung II gegeben.

Im Anschluss wird noch folgendes hinzugefügt:

Glyzerin	15,8 g (= 13 ml)
Streptomycin	0,005 g
Humanalbumin	2,0 g (= 2,8 ml)

Die entstandene Lösung wird steril filtriert und bleibt bei - 20°C bis zum Gebrauch eingefroren. Zur besseren Handhabung wurde die Gefrierlösung in 1 ml Portionen eingefroren.

3.7 Statistik

Für die statistische Auswertung, sowie zur Erstellung von Tabellen und Boxplots wurde das Statistikprogramm IBM SPSS Statistics Version 23 verwendet. Ein Diagramm wurde mithilfe von Microsoft Excel 2010 erstellt (siehe Abbildung 29).

3.7.1 Deskriptive Statistik

Um einen Eindruck der verschiedenen Variablen, ihrer Verteilung, sowie ihrer Veränderungen im Laufe der Gefrier- und Auftauzyklen zu bekommen, wurde zunächst eine deskriptive Statistik erstellt. Dafür wurde für alle quantitativen Werte jeweils der Mittelwert, bzw. der Median bestimmt. Die jeweiligen Testergebnisse der 40 Probanden wurden als unabhängige Werte erfasst und beurteilt ob eine Normalverteilung vorliegt. Pro Proband lagen sechs Messzeitpunkte der verschiedenen Variablen (Gesamtspermienzahl, Vitalität, usw.) vor: Einmal nativ ca. 30 Minuten nach Ejakulation und im Anschluss bei Zyklus 1 bis 5 (= entspricht Messung nach 1. – 5. Gefriervorgang). Zu den sechs Messzeitpunkten wurden für die einzelnen Variablen Boxplots erstellt.

Bei einer Normalverteilung wurde im Verlauf der Messungen für den Mittelwert und den Median ein ähnliches Ergebnis erzielt. Außerdem handelte es sich um einen symmetrischen Boxplot, ohne Ausreißer. War der Wert normalverteilt, so wurde er durch Mittelwert und Standardabweichung näher beschrieben. Kam es bei den Messungen zu unsymmetrischen Boxplots mit Ausreißern, sowie einer großen Differenz zwischen Mittelwert und Median, so konnte davon ausgegangen werden, dass dieser Wert nicht normalverteilt war. Infolge dessen wurde hier der Median und der Interquartilbereich zur Beschreibung der Ergebnisse herangezogen.

Für qualitative Werte wurden die absoluten und relativen Häufigkeiten ermittelt.

3.7.2 Verallgemeinerte Schätzgleichung

Um im Anschluss an die deskriptive Statistik zu prüfen, ob ein Zusammenhang bzw. eine Korrelation zwischen den einzelnen gemessenen Variablen über die fünf Gefrier- und Auftauprozesse hinweg besteht, wurde eine verallgemeinerte Schätzgleichung mit austauschbarer Korrelationsmatrix durchgeführt. Die verallgemeinerte Schätzgleichung wird auch als generalized estimating equation (GEE) – Analyse bezeichnet.

Die Proben, bzw. die verschiedenen Probanden (1 - 40) wurden als Subjektvariable und der Messzeitpunkt nativ, sowie der Zyklus 1 - 5 als Innersubjektvariable definiert.

Nacheinander wurden die Messergebnisse von Motilität, Vitalität, abnormale Morphologie, DNA Tunel positiv und Caspase 3 positiv betrachtet und ihre mögliche Abhängigkeit von sogenannten Kovariaten (Gesamtspermienzahl, Eosin usw.) untersucht. War die abhängige Variable normalverteilt, so konnten bei der Analyse die verallgemeinerten linearen Modelle verwendet werden. Bei nicht normalverteilten Variablen wurde eine Gamma-Verteilung für den Modelltyp verwendet.

Werte die nur nativ bestimmt wurden (Alter, BMI, MAR) wurden nicht nur nativ eingetragen, sondern auch in die Zeitspalte Zyklus 1 – 5 wurde der gleiche Wert übertragen. Da das Probandenalter, der BMI und Ergebnis des MAR-Tests über die einzelnen Zyklen hinweg konstant bleiben.

Die Vitalität mittels HOS-Test wurde nur nativ und nach dem ersten Gefriervorgang bestimmt, deshalb konnte hier nur eine Korrelation im Verlauf von nativ bis Zyklus 1 geprüft werden. Die restlichen Zeitpunkte blieben „leer“ und konnten so in keine Berechnungen mit einbezogen werden.

Die Ergebnisse des ermittelten Regressionskoeffizienten, des 95%igen Konfidenzintervalls, sowie Signifikanz mit p-Wert und dem adjustiertem p-Wert wurden für die einzelnen abhängigen Variablen in einer Tabelle dokumentiert. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen, bei $p < 0,001$ war von einem hoch signifikanten Zusammenhang auszugehen. Der adjustierte p-Wert berücksichtigt den Fehler 1. Art und wurde mittels Korrekturverfahren nach Holm angepasst [57]. Durch die Adjustierung sollten Fehler durch multiples Testen berücksichtigt werden.

Der Regressionskoeffizient beschrieb die Änderung der abhängigen Variable über die Zeit hinweg, wenn sich die Unabhängige um den Wert 1 ändert. Das 95%ige Konfidenzintervall wiederum gab den Bereich an, in dem sich zu 95 % der ermittelte Schätzer (= Regressionskoeffizient) befand. Das Konfidenzintervall sollte nicht den Wert Null enthalten, denn sonst bestand die Möglichkeit, dass der Regressionskoeffizient Null war und somit würde kein Zusammenhang bestehen. War die Null im Konfidenzintervall enthalten, so war von keinem statistisch signifikantem Zusammenhang auszugehen. Durch das Konfidenzintervall konnte ermittelt werden, wie unsicher der Schätzer ist.

Weiterhin funktionierte die Funktion zur Berechnung der verallgemeinerten Schätzgleichung im SPSS nur, wenn die abhängige Variable nicht die Null annahm. Die Gesamtmotilität war im Verlauf der Einfrier- und Auftauzyklen in mehreren Fällen Null. Da eine Umstrukturierung

des Datensatzes bei SPSS nicht möglich war, wurde zu allen Werten der Gesamtmotilität 0,01 addiert. Dieser kleine Wert fällt bei der Berechnung nicht ins Gewicht, ermöglichte aber die Anwendung der Verallgemeinerten Schätzgleichung für Motilität als abhängige Variable. Bei der Beschreibung anderer abhängiger Variablen (Vitalität, Morphologie, ...) konnte die Motilität als Kovariate mit den „ursprünglichen“ Ergebnissen zur Berechnung herangezogen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik

Es wurde im Anschluss an die Auswertung die Tabelle 1 erstellt, in der entweder Mittelwert und Standardabweichung (bei Normalverteilung) oder Median und Interquartilbereich (keine Normalverteilung) eingetragen wurden. So kann die Änderung der Werte nach den jeweiligen Einfrier- und Auftauzyklen beobachtet werden.

	Nativ	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Gesamtspermienzahl (Mill.) <i>Median (IQR)</i>	238 (353,75)	107,8 (162,58)	76,7 (112,38)	53,35 (84,5)	38,85 (57,63)	21 (32,33)
Volumen (ml) <i>Median (IQR)</i>	3,5 (2)	4,6 (1)	3,6 (1)	3 (1)	2 (0)	1,5 (0)
Spermatozoendichte (Mill./ml) <i>Median (IQR)</i>	68,5 (70)	21,5 (29)	20 (28)	16 (28)	18 (23)	14,5 (22)
Gesamtmotilität (%) <i>Median (IQR)</i>	70 (19)	38,25 (28)	17 (17)	7 (12)	0 (5)	0 (0)
Motilität global (%) <i>Median (IQR)</i>	50 (17)	26 (21)	8 (12)	0 (5)	0 (0)	0 (0)
Motilität stationär (%) <i>Median (IQR)</i>	17 (12)	11,75 (9)	9,5 (9)	5 (9)	0 (3)	0 (0)
Motilität immotil (%) <i>Median (IQR)</i>	30 (19)	61,75 (28)	83 (17)	93 (12)	100 (5)	100 (0)
Eosin (%) <i>Median (IQR)</i>	66,5 (13)	28 (15)	16,5 (11)	9 (9)	5 (6)	3 (2)
HOS (%) <i>MW +/- SD</i>	76,06 +/- 7,44	47,2 +/- 11,06				
Abnormality (%) <i>Median (IQR)</i>	95,9 (3)	97,1 (3)	97,4 (3)	97,8 (2)	97,8 (3)	98,3 (3)
Abnormality of head (%) <i>MW +/- SD</i>	83,56 +/- 6,47	82,33 +/- 6,93	82,97 +/- 8,03	81,85 +/- 7,37	84,36 +/- 7,10	84,96 +/- 6,41
Abnormality of midpiece (%) <i>Median (IQR)</i>	42,80 (10)	36,85 (13)	39,65 (13)	37,2 (9)	39,5 (7)	41,9 (11)
Abnormality of tail (%) <i>MW +/- SD</i>	63,82 +/- 16,18	55,99 +/- 16,48	54,84 +/- 17,05	59,89 +/- 15	54,9 +/- 13,76	53,18 +/- 15,98
Normale Morphologie (%) <i>Median (IQR)</i>	4,1 (3)	2,9 (3)	2,6 (3)	2,2 (2)	2,2 (3)	1,7 (3)
Peroxidase (Leukos Mill./ml) <i>MW +/- SD</i>	0,42 +/- 0,28					
MAR (%) <i>Median (IQR)</i>	5,75 (7)					
DNA Tunel positiv (%) <i>MW +/- SD</i>	22,04 +/- 6,58	32,7 +/- 8,44	43,03 +/- 12	50,83 +/- 12,16	60,43 +/- 10,78	67,58 +/- 9,74
Caspase 3 positiv (%) <i>MW +/- SD</i>	7,8 +/- 4,53	17,88 +/- 9,18	24,4 +/- 10,21	30,35 +/- 11,88	36,4 +/- 14,77	45,25 +/- 16,43
pH <i>Median (IQR)</i>	8,5 (0)					
Alter (Jahren) <i>Median (IQR)</i>	23 (3)					
BMI (m²/kg) <i>Median (IQR)</i>	23,67 (2)					

Tabelle 1

MW= Mittelwert, SD= Standardabweichung, IQR=Interquartilsabstand.

4.1.1 Gesamtspermienzahl, Volumen, Spermatozoendichte

Die Gesamtspermienzahl beträgt nativ median 238 Millionen, die Spermatozoendichte 68,5 Mill/ml und das Volumen 3,5 ml (siehe Tabelle 1). Die Werte der Probanden sind nicht normalverteilt. Bei Messung nach dem fünften Einfrier-Zyklus ist eine Gesamtspermienzahl von 21 Millionen übrig. Dies entspricht einem Anteil von 8,8 % des Ausgangswertes. Die Abnahme der Gesamtspermienzahl ist in Abbildung 23 dargestellt. Das Volumen beträgt im Mittel bei der letzten Messung 1,5 ml, die Spermatozoendichte 14,5 Mill/ml.

Alle 40 teilnehmenden Probanden sind als fertil zu bezeichnen. Die Spermatozoendichte und das Volumen lag bei ihnen im Normbereich (Dichte ≥ 15 Mill/ml und Volumen $\geq 1,5$ ml) – siehe auch Anhang 1. Die Gesamtspermienzahl war allerdings bei drei Probanden erniedrigt (einmal 20, 14 und 13 Millionen). Laut Norm sollte die Gesamtspermienzahl über 39 Millionen liegen (vergleiche Anhang 1).

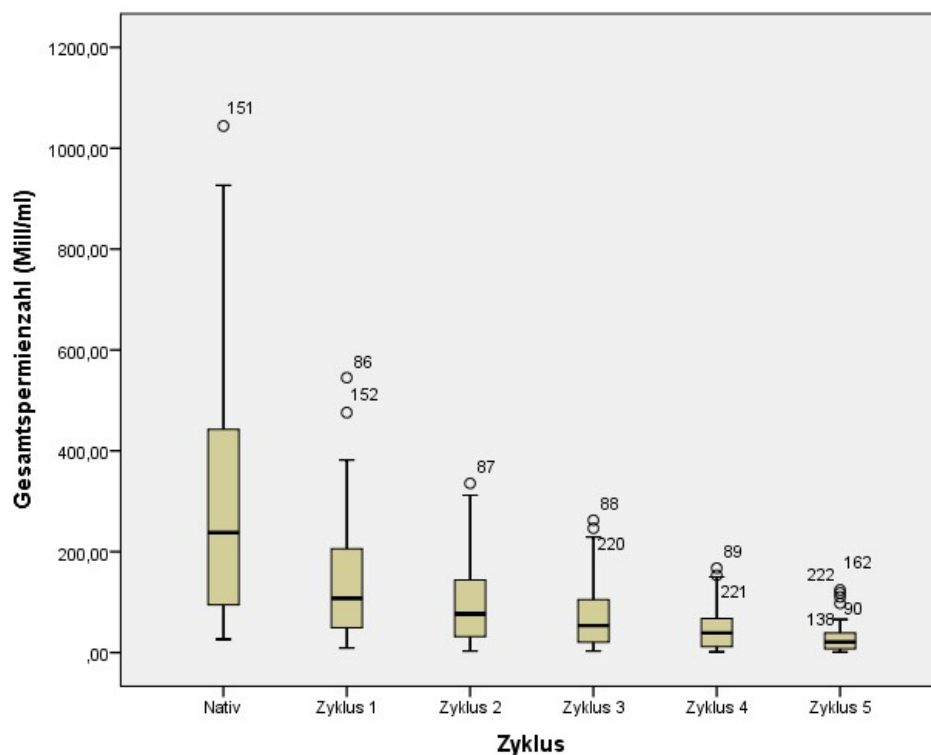


Abbildung 23

Entwicklung der Gesamtspermienzahl nativ bis zur Auswertung nach Zyklus 5.

4.1.2 Motilität

Die Messwerte der Motilität sind nicht normalverteilt. Die Gesamtmotilität, zusammengesetzt aus globaler und stationärer Beweglichkeit beträgt nativ 70 %, nach dem vierten Einfrierzyklus sind bei mehr als 50 % der Probanden keine motilen Spermien mehr vorhanden (siehe Tabelle 1 und Abbildung 24). Beim 5. Zyklus haben noch sieben Probanden motile Spermien nachzuweisen, diese sind alle nur stationär beweglich.

Alle Patienten erreichten nativ eine Gesamtmotilität über 40 % und liegen somit im Normbereich (siehe Anhang 1).

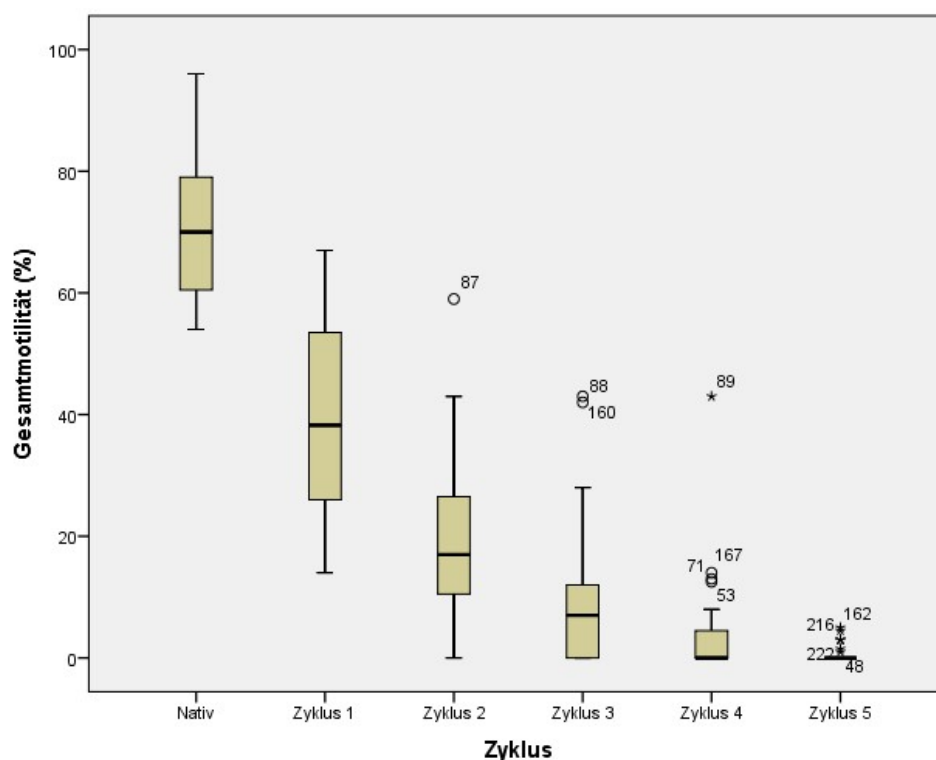


Abbildung 24

Entwicklung der Gesamtmotilität nativ bis zur Auswertung nach Zyklus 5.

4.1.3 Vitalität

Die Vitalität wurde durch die Tests mittels Eosin und HOS untersucht. Nativ sind im Mittel 66,5 % beim Eosin-Test und 76,06 % beim HOS Test vital. Nach dem ersten Einfrieren wird beim Eosin ein mittleres Testergebnis von 28 %, beim HOS von 47,2 % erzielt. Nach dem fünften Gefrierzyklus können beim Eosin-Test im Mittel noch 3 % vitale Spermien ermittelt werden (siehe Tabelle 1 und Abbildung 25).

Insgesamt hatten die Probanden beim Eosin-Test alle eine Vitalität ≥ 50 %. Nur ein Proband lag leicht darunter, dafür konnte man bei diesem Patienten eine erhöhte Gesamtspermienzahl verzeichnen. Dem HOS-Test zu Folge hatten alle Probanden mehr als 50 % vitale Spermien.

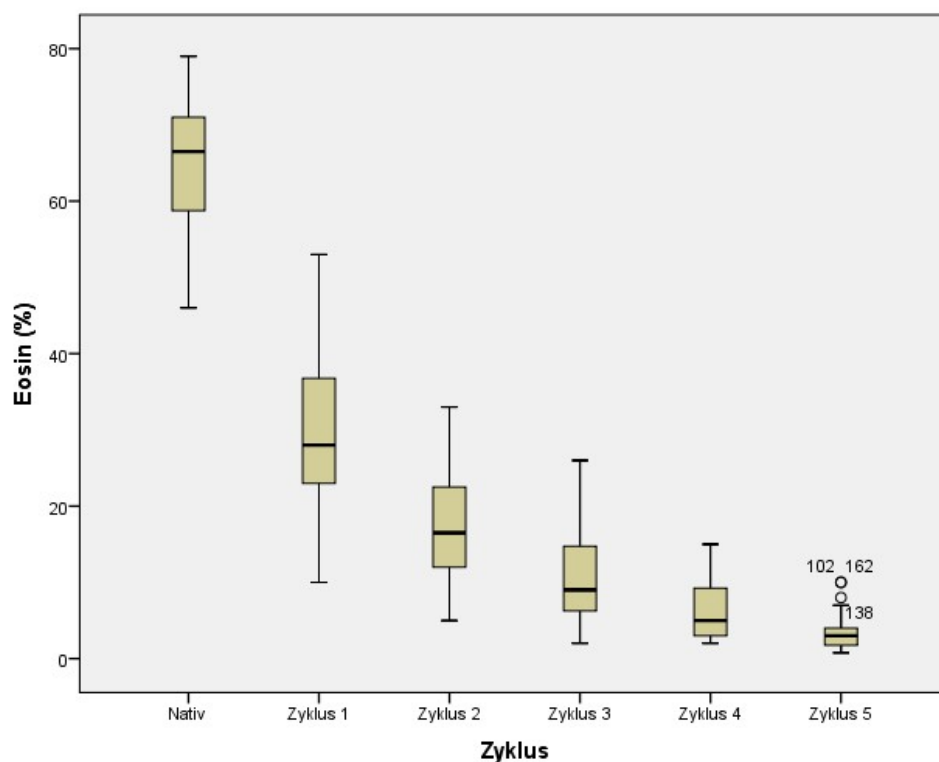


Abbildung 25

Entwicklung der Vitalität mittels Eosin-Test nativ und nach Zyklus 1-5.

4.1.4 Morphologie

Die Morphologie wurde zur einfacheren Darstellung und zum besseren Vergleich nur in die Gruppen „Abnormality“ (= schließt alle Spermien ein, die eine abnormale Morphologie besitzen), „Abnormality of head“, „Abnormality of midpiece“ und „Abnormality of tail“ eingeteilt. Spermien, die klassifiziert durch den medeaLAB Morphology Analyzer z.B. einen abnormalen Spermienkopf und ein abnormales Mittelstück hatten, wurden in beiden

Gruppen („Abnormality of head“ und „Abnormality of midpiece“) gezählt. Die Spermien mit normaler Morphologie wurden ebenfalls erfasst und stellen den Kehrwert der Spermien mit abnormaler Morphologie insgesamt dar.

Die Entwicklung der „Abnormality“, oder auch „abnormale Morphologie insgesamt“, beträgt anfangs 95,9 %. Sie ist mit einigen Ausreißern und unsymmetrischen Boxplots nicht normalverteilt. Nach dem fünften Gefrierzyklus ist von einer abnormalen Morphologie im Mittel von 98,3 % auszugehen (siehe Tabelle 1 und Abbildung 26). Die normale Morphologie verhält sich konträr dazu (nativ 4,1 %, nach dem fünften Zyklus 1,7 %).

Die abnormale Morphologie am Spermienkopf beträgt nativ im Mittel 83,56%, bei der letzten Messung 84,96 %. Das Mittelstück ist bei 42,8 % der Probanden nativ und 41,9 % nach dem fünften Einfrieren abnorm. Eine abnorme Morphologie am Spermischwanz haben im Mittel 63,82 % der Spermien nativ und 53,18 % bei Zyklus 5.

Von den teilnehmenden Probanden hatten nativ sechs Probanden eine erhöhte Anzahl Spermien mit abnormaler Morphologie, 18 hatten genau 3 – 4 % morphologisch normale Spermien und 16 eine erhöhte Anzahl Spermien mit normaler Morphologie. Keiner der Probanden hatte nativ einen Anteil normal geformter Spermien von 25 % oder höher.

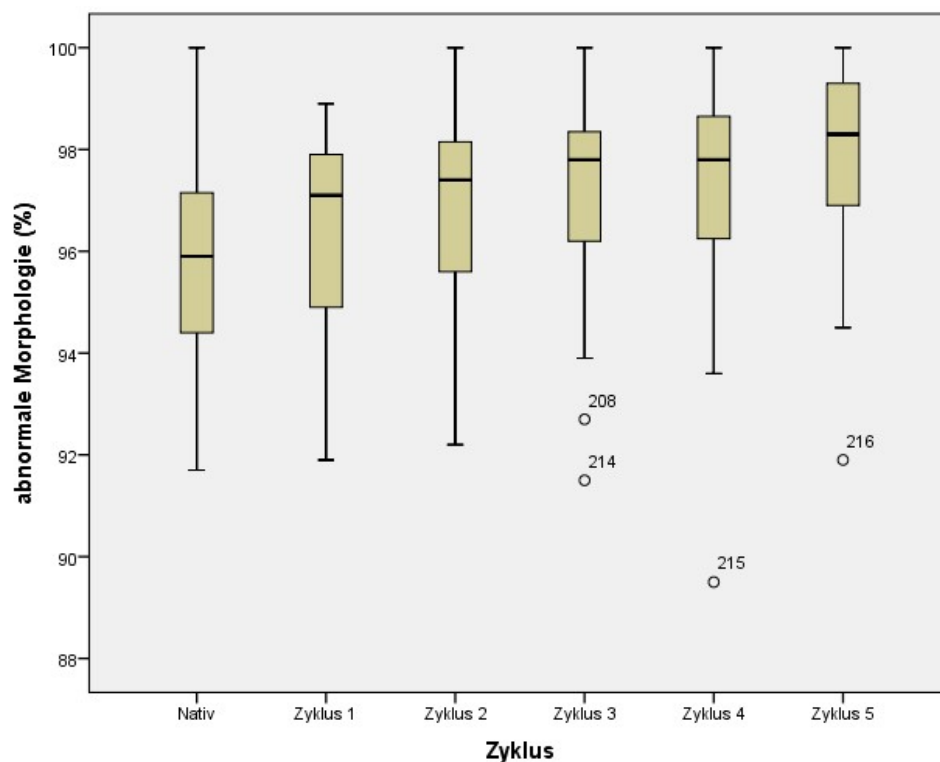


Abbildung 26

Entwicklung der abnormalen Morphologie insgesamt.

4.1.5 Peroxidase und MAR

Peroxidase und der MAR-Test wurden nur nativ ermittelt. Das Testergebnis der Peroxidase war bei den Probanden normalverteilt mit einem Mittelwert von 0,42 Millionen Leukozyten pro ml und einer Standardabweichung von 0,28. Das Testergebnis des MAR-Tests ist nicht normalverteilt, der Median liegt insgesamt bei 5,75 % (siehe Tabelle 1).

Bei keinem der Probanden konnte eine erhöhte Anzahl von Leukozyten nachgewiesen werden und keiner der Probanden hatte ein Testergebnis des MAR-Tests mit mehr als 40 % Agglutination.

4.1.6 DNA Tunel positiv

Das Testergebnis beschreibt die DNA-Fragmentierung der Spermien, ist normalverteilt und beträgt nativ 22,04 %, nach dem fünften Einfrieren 67,58 % (siehe Tabelle 1 und Abbildung 27).

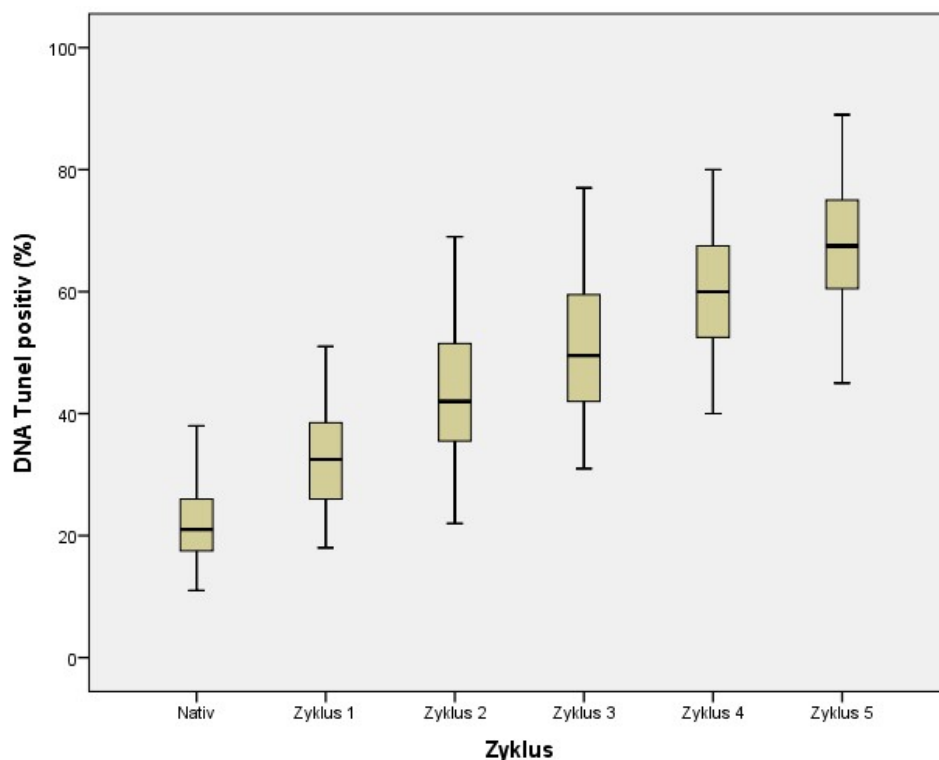


Abbildung 27

Entwicklung des Testergebnisses TUNEL positiv (apoptotisch) nativ und nach Zyklus 1-5.

4.1.7 Caspase 3 positiv

Caspase 3 positiv stellt sich normalverteilt dar. Der Mittelwert liegt nativ bei 7,8 % und nach dem letzten Einfrieren bei 45,25 % (siehe Abbildung 28 und Tabelle 1).

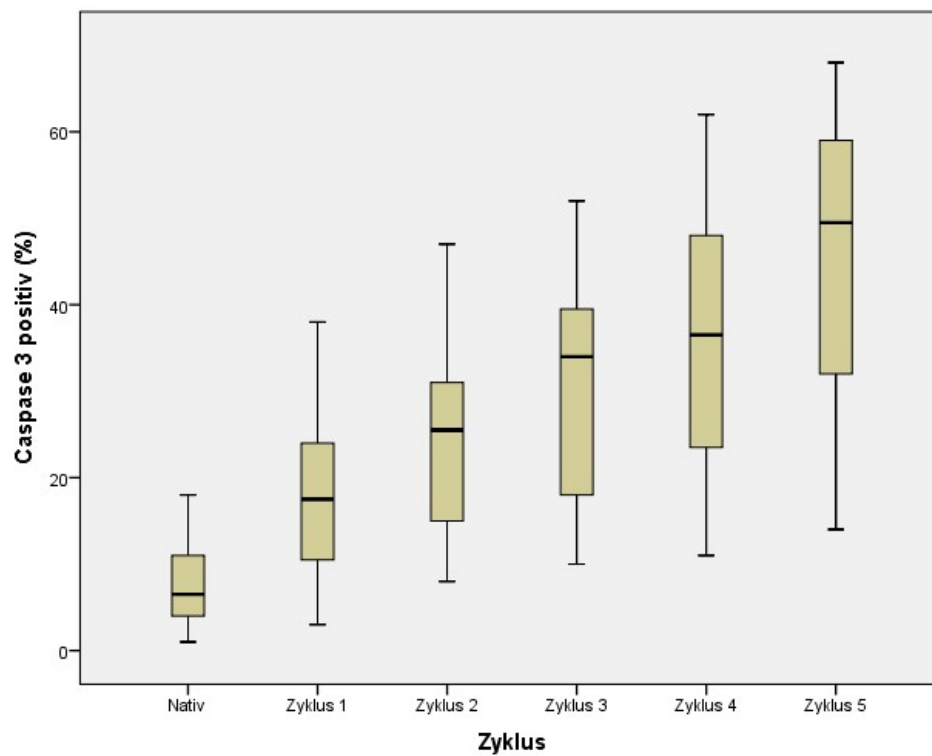


Abbildung 28

Entwicklung des Testergebnisses Caspase 3 positiv (apoptotisch) nativ und nach Zyklus 1-5.

4.1.8 pH

Der pH-Wert war nicht normalverteilt, es finden sich einige Ausreißer nach oben, mit einem leicht basischen pH-Wert. Die ermittelten pH-Werte der 40 Probanden lagen alle im Bereich von 8 bis 10. Insgesamt liegt der Median nativ bei 8,5 (siehe Tabelle 1).

4.1.9 Viskosität

Da die Viskosität der einzig qualitative Wert ist, erfolgt hier keine Bestimmung des Mittelwerts oder Medians, sondern die Ermittlung der absoluten und relativen Häufigkeiten. 37,5 % der Probanden haben leicht visköses Ejakulat, 27,5 % normal visköses und 35 % stark visköses Ejakulat (siehe Tabelle 2). Dies entspricht den relativen Häufigkeiten. Die absolute Häufigkeit beschreibt die genaue Anzahl der Probanden, welche eine entsprechende Qualität der Viskosität aufweisen.

Viskosität	Absolute Häufigkeit (Anzahl):	Relative Häufigkeit (%):
1=leicht	1 = 15	1 = 37,5 %
2=viskös	2 = 11	2 = 27,5 %
3=stark	3 = 14	3 = 35 %
MW und SD		

Tabelle 2

Absolute und relative Häufigkeit der Viskosität.

4.2 Verallgemeinerte Schätzgleichung

4.2.1 Gesamtmotilität

Für die Berechnung wurde zu allen Werten der Gesamtmotilität 0,01 addiert, was die Anwendung der Verallgemeinerten Schätzgleichung für diesen Wert erlaubte (siehe Kapitel 3.7.2). Wie in Tabelle 3 ersichtlich, hängt die Gesamtmotilität mit Gesamtspermienzahl, Vitalität, abnormaler Morphologie, dem Testergebnis TUNEL DNA positiv und Caspase 3 positiv, sowie dem BMI zusammen.

Ändert sich die Gesamtspermienzahl um eine Einheit (Wert 1) so kommt es im zeitlichen Verlauf zu einer statistisch signifikanten ($p < 0,001$) Zunahme der Motilität um 0,39 % [95 % KI: 0,25; 0,52]. Zur Zunahme der Motilität um 0,97 % kommt es, wenn im Eosin Test 1 % mehr vitale Spermien vorliegen. Liegen im HOS-Test 1 % mehr vitale Spermien vor, so kommt es zur Motilitätszunahme von 0,7 %. Liegen 1 % mehr amorphe Spermien vor, so reduziert sich die Gesamtmotilität um -4,55 % über die Zeit der fünf Gefrierzyklen hinweg. Ist das Testergebnis des DNA Tunel positiv um den Wert 1 erhöht, so besteht über die Zeit hinweg eine Abnahme der Motilität um -0,5 %. Ähnlich verhält es sich mit dem Test der Caspase. Liegen 1 % mehr Caspase positive Spermien vor, so ist die Motilität im Schnitt um -0,57 % gesunken. Auch der BMI besitzt einen signifikanten Zusammenhang mit der Motilität. Ist der BMI um 1 erhöht, so erhöht sich die Anzahl der motilen Spermien um 0,65 %. Keine Assoziation besteht zwischen der Gesamtmotilität und dem Antikörper-Suchtest (MAR), sowie dem Alter.

Variable	Regressions- koeffizient	95 % Konfidenz- intervall Unterer Wert	95 % Konfidenz- intervall Oberer Wert	Signifikanz (p-Wert)	Adjustierter p-Wert
Gesamtspermienzahl (Mill.)	0,39	0,25	0,52	1,6541E-8	P < 0,001
Eosin (%)	0,97	0,82	1,11	0,0E0	P < 0,001
HOS (%) <i>Nur Nativ und Z1</i>	0,70	0,53	0,88	3,7748E-15	P < 0,001
Abnormality (%)	-4,55	-6,33	-2,77	5,4788E-7	P < 0,001
MAR (%) <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	0,23	-0,02	0,47	0,068243	0.887159
TUNEL DNA positiv (=apoptotisch)	-0,50	-0,59	-0,41	0,0E0	P < 0,001
Caspase positiv (=apoptotisch)	-0,57	-0,65	-0,48	0,0E0	P < 0,001
Alter <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	0,08	-0,25	0,42	0,622744	1
BMI (m²/kg) <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	0,65	0,23	1,07	0,002468	0.041956

Tabelle 3

Assoziation zwischen Gesamtmotilität als abhängige Variable und den anderen Testergebnissen.

4.2.2 Vitalität

Die Vitalität der Spermien, ermittelt durch Eosin, ist über die Zeit hinweg gesehen mit der Gesamtmotilität, dem HOS-Test und der abnormalen Morphologie assoziiert. Keine Assoziation besteht zwischen Vitalität und der Gesamtspermienzahl, dem Ergebnis des Antikörper-Suchtest (MAR), sowie BMI und Alter. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zu sehen.

Ist die Gesamtmotilität im zeitlichen Verlauf um 1 erhöht, so kommt es zur signifikanten ($p < 0,001$) Zunahme der Vitalität, gemessen durch den Eosin-Test, um 0,71 % [95 % KI: 0,66; 0,76]. Der HOS-Test beschreibt ebenfalls die Vitalität. Ist das Testergebnis um 1 % erhöht, so ist das Eosin-Testergebnis um 0,85 % ebenfalls erhöht. Liegen 1 % mehr abnorme Spermien vor, kommt es zur Abnahme der Vitalität um 2,28 % über die fünf Gefrierzyklen hinweg gesehen.

Für die Variablen DNA TUNEL positiv und Caspase 3 positiv kann keine Aussage getroffen werden. Ein Ergebnis konnte im SPSS nicht ermittelt werden.

Variable	Regressions- koeffizient	95 % Konfidenz- intervall Unterer Wert	95 % Konfidenz- intervall Oberer Wert	Signifikanz (p-Wert)	Adjustierter p-Wert
Gesamtspermienzahl (Mill.)	0,37	-0,44	1,19	0,371482	1
Gesamtmotilität (%)	0,71	0,66	0,76	0,0E0	P < 0,001
HOS (%) <i>Nur Ergebnis Nativ und Z1</i>	0,85	0,75	0,94	0,0E0	P < 0,001
Abnormality (%)	-2,28	-3,39	-1,17	0,000056	0.001064
MAR (%) <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	0,10	-0,05	0,25	0,201876	1
TUNEL DNA positiv (=apoptotisch)	*	*	*	*	*
Caspase positiv (=apoptotisch)	*	*	*	*	*
Alter <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	-0,08	-0,31	0,14	0,470709	1
BMI (m²/kg) <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	0,21	-0,20	0,62	0,320900	1

Tabelle 4

Assoziation zwischen Vitalität (Eosin) als abhängige Variable und den anderen Testergebnissen.

*Konnte im SPSS nicht ermittelt werden: Rechnungsproblem, es wurde keine Konvergenz erreicht. (Die Ergebnisse für TUNEL DNA positiv und Caspase 3 positiv in Bezug auf Vitalität als abhängige Variable konnten im SPSS nicht ermittelt werden)

4.2.3 Morphologie abnormal insgesamt

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen „Abnormality“ (= abnormale Morphologie insgesamt) und den folgenden Variablen: Gesamtmotilität, Vitalität ermittelt durch Eosin, sowie den Testergebnissen von DNA Tunel positiv und Caspase 3 positiv. Keine Assoziation besteht mit der Gesamtspermienzahl, mit dem HOS-Test, dem MAR-Test, sowie dem BMI und dem Alter.

Ist die Gesamtmotilität um 1 % erhöht, so kann man über die Zeit betrachtet von einer Abnahme der abnormen Morphologie um -0,02 % ausgehen. Bei Zunahme der Vitalität im Eosin-Test um 1 % käme es ebenfalls zu einer Abnahme der „Abnormality“ um -0,03 %. Ändert sich das Testergebnis der DNA Tunel positiven Spermien um eine Einheit, so kommt es im zeitlichen Verlauf zur Zunahme der abnormen Morphologie von 0,04 % [95 % KI: 0,03; 0,05]. Um 0,05 % nimmt die abnormale Morphologie insgesamt zu, wenn sich die Anzahl der Caspase 3 positiven Spermien um 1 % erhöht. Die Ergebnisse der verallgemeinerten Schätzgleichung mit „Morphologie abnormal insgesamt“ als abhängige Variable sind in Tabelle 5 festgehalten.

Variable	Regressions- koeffizient	95 % Konfidenz- intervall Unterer Wert	95 % Konfidenz- intervall Oberer Wert	Signifikanz (p-Wert)	Adjustierter p-Wert
Gesamtspermienzahl (Mill.)	-0,003	-0,006	-0,001	0,015365	0.230475
Gesamtmotilität (%)	-0,02	-0,03	-0,02	2,0422E-11	P < 0,001
Vitalität Eosin (%)	-0,03	-0,04	-0,02	1,9818E-8	P < 0,001
HOS (%) <i>Nur Ergebnis Nativ und Z1</i>	-0,02	-0,03	0,000	0,056202	0.786828
MAR (%) <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	-0,05	-0,12	0,02	0,187922	1
TUNEL DNA positiv (=apoptotisch)	0,04	0,03	0,05	1,07E-10	P < 0,001
Caspase positiv (=apoptotisch)	0,05	0,04	0,06	0,0E0	P < 0,001
Alter <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	0,01	-0,12	0,15	0,860564	1
BMI (m²/kg) <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	-0,05	-0,21	0,12	0,570567	1

Tabelle 5

Assoziation zwischen abnormaler Morphologie als abhängige Variable und den anderen Testergebnissen.

4.2.4 DNA Tunel positiv

DNA Tunel positiv wurde als abhängige Variable definiert und über die fünf Gefrierzyklen hinweg untersucht, von welchen anderen Variablen das Testergebnis abhängig ist. Wie in Tabelle 6 dargestellt, liegt über die Zeit hinweg gesehen ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang zwischen einem positiven Testergebnis des DNA Tunel Tests und der Gesamtspermienzahl, der Motilität, der Vitalität, der Morphologie, der Caspase 3 , sowie dem Alter vor.

Besteht eine Gesamtspermienzahl, die um den Wert 1 höher ist, so kommt es zur statistisch signifikanten ($p < 0,001$) Abnahme der DNA Tunel positiven Spermien um -0,75 %. Bei der Motilität wird die Gesamtmotilität betrachtet. Nimmt diese um den Wert 1 zu, so nimmt der Anteil an Tunel-positiven Spermien um -0,52 % ab. Es verhält sich ähnlich bei den Vitalitätstests. Haben wir um den Faktor 1 mehr vitale Spermien ermittelt durch den Eosin Test, so nimmt die Anzahl der DNA Tunel positiven Spermien um den Faktor -0,64 % ab. Bei der Zunahme HOS-positiver Spermien um den Wert 1 kommt es zu einer Abnahme der apoptotischen Spermien von -0,34 %. Betrachtet man die Gesamtheit der abnormen Spermien, so besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit DNA Tunel-positiven Spermien. Kommt es zu einer Zunahme der abnormalen Morphologie um 1%, so steigt die

Anzahl der Spermien mit DNA Tunel-positiven Testergebnis um den Faktor 4,46 %. Auch die Anzahl der Caspase 3 positiven Spermien sind assoziiert mit dem Testergebnis des DNA Tunels über die fünf Gefrierzyklen hinweg. Kommt es zur Zunahme der Caspase 3 positiven Spermien um 1 % so steigt die Anzahl der DNA Tunel positiven Spermien um 1,05 %. Das Alter steht in statistisch signifikanten ($p < 0,001$) Zusammenhang mit dem DNA Tunel Test. Handelt es sich um einen Proband, der im Durchschnitt 1 Jahr älter ist, so kommt es zur Zunahme der apoptotischen Spermien um 0,63 %. Für den MAR-Test und den BMI besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Testergebnis des DNA Tunel positiv über die Zeit hinweg. Der p-Wert ist größer als 0,05, somit ist das Testergebnis des DNA Tunel vom Ergebnis des MAR-Tests und dem BMI nicht abhängig.

Variable	Regressions- koeffizient	95 % Konfidenz- intervall Unterer Wert	95 % Konfidenz- intervall Oberer Wert	Signifikanz (p-Wert)	Adjustierter p-Wert
Gesamtspermienzahl (Mill.)	-0,75	-0,1	-0,05	2,9118E-10	P < 0,001
Gesamtmotilität (%)	-0,52	-0,56	-0,49	0,0E0	P < 0,001
Eosin (%)	-0,64	-0,69	0,6	0,0E0	P < 0,001
HOS (%) <i>Nur Auswertung nativ und Z1</i>	-0,34	-0,41	-0,27	0,0E0	P < 0,001
Abnormality (%)	4,46	2,35	6,56	0,000033	P < 0,001
MAR (%) <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	0,19	-0,06	0,44	0,129825	1
Caspase 3 positiv	1,05	0,95	1,14	0,0E0	P < 0,001
Alter <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	0,63	0,26	1,01	0,000994	0.017892
BMI (m²/kg) <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	-0,25	-1,08	0,58	0,556987	1

Tabelle 6

Assoziation zwischen DNA Tunel positiv (=apoptotisch) als abhängige Variable und den anderen Testergebnissen.

4.2.5 Caspase 3 positiv

Es existiert ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Testergebnis Caspase 3 positiv und der Gesamtspermienzahl, Gesamtmotilität, der Vitalität, der abnormalen Morphologie und DNA Tunel positiv. Das Testergebnis Caspase 3 positiv ist folglich von den genannten Parametern abhängig. Unabhängig ist das Testergebnis von BMI und dem Ergebnis des Antikörper-Suchtests (MAR). Die Ergebnisse werden stets über die fünf Gefrierzyklen hinweg betrachtet. Die genauen Testergebnisse sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Erhöht sich die Gesamtspermienzahl um eine Einheit, so liegen -0,06 % weniger Caspase 3 positive Spermien vor. Ähnlich verhält es sich mit der Gesamtmotilität. Erhöht sich diese um 1 %, so ist der Anteil der Caspase 3 positiven, apoptotischen Spermien um -0,42 % verringert. Das Testergebnis Caspase 3 positiv ist auch mit der Vitalität assoziiert, wenn man den Verlauf über die Zeit betrachtet. Liegen um den Wert 1 mehr Eosin oder HOS-positive Spermien vor, so kommt es im Mittel zu einer Abnahme der Caspase 3 positiven Spermien um -0,51 % (Eosin) und -0,26 % (HOS). Bei der Morphologie besteht eine Assoziation des Testergebnisses von Caspase 3 positiv mit dem Parameter „Abnormality“. Liegt eine um den Wert 1 erhöhte Anzahl abnormaler Spermien vor, so erhält man über die fünf Gefrierzyklen hinweg gesehen 5,61 % mehr Caspase 3 positive Spermien. Liegen 1% mehr DNA Tunel positive Spermien vor, so erhöht sich die Anzahl der Caspase 3 positiven Spermien um 0,7 %. Zwischen dem Alter und Caspase 3 positiv liegt bei Betrachtung des „normalen“ p-Wertes ein signifikanter Zusammenhang vor, der besagt dass bei erhöhtem Alter um 1 Jahr die Anzahl der Caspase 3 positiven Spermien um 0,73 % zunimmt. Betrachtet man allerdings den adjustierten p-Wert, der einen Fehler durch multiples Testen ausschließen soll, so besteht keine Assoziation. Unabhängig ist das Testergebnis der Caspase 3 vom MAR Test und vom BMI der Probanden.

Variable	Regressions- koeffizient	95 % Konfidenz- intervall Unterer Wert	95 % Konfidenz- intervall Oberer Wert	Signifikanz (p-Wert)	Adjustierter p-Wert
Gesamtspermienzahl (Mill.)	-0,06	-0,08	-0,04	2,7784E-8	P < 0,001
Gesamtmotilität (%)	-0,42	-0,46	-0,37	0,0E0	P < 0,001
Eosin (%)	-0,51	-0,57	-0,45	0,0E0	P < 0,001
HOS (%) <i>Nur Nativ und Zyklus 1</i>	-0,26	-0,33	-0,19	3,4895E-12	P < 0,001
Abnormality (%)	5,61	4,22	7,00	2,8866E-15	P < 0,001
MAR (%) <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	-0,13	-0,68	0,42	0,643803	1
TUNEL DNA positiv (=apoptotisch)	0,70	0,63	0,76	0,0E0	P < 0,001
Alter <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	0,73	0,19	1,26	0,008364	0.133824
BMI (m²/kg) <i>Gleicher Wert nativ bis Zyklus 5</i>	-0,18	-0,98	0,63	0,666069	1

Tabelle 7

Assoziation zwischen Caspase 3 positiv (=apoptotisch) als abhängige Variable und den anderen Testergebnissen.

4.3 Zeitlicher Verlauf

Für eine bessere Übersicht der einzelnen Parameter über die Zeit wurde die Abbildung 29 angefertigt. Es wurde für die Testergebnisse DNA Tunel positiv, Caspase 3 positiv, Gesamtmotilität, Morphologie abnormal insgesamt und Vitalität Eosin jeweils der Median zu den einzelnen Messzeitpunkten (nativ und Zyklus 1 bis 5) bestimmt. Anschließend konnte mithilfe der Mediane eine Graphik erstellt werden in der sich die einzelnen Parameter und ihr Verlauf über die fünf Gefrierzyklen hinweg gegenüber stehen.

Die DNA Tunel positiven Spermien, sowie die Caspase 3 positiven Spermien nehmen im Verlauf stetig zu. Die Gesamtmotilität und die Vitalität (ausgedrückt durch Eosin) nehmen zunächst stark ab, dann flacht die Kurve ab und nähert sich der Null. Die Gesamtmotilität ist bereits ab der 4. Messung im Median Null. Die Morphologie abnormal insgesamt zeigt sich als sehr flache Gerade mit nur ganz geringer Steigung.

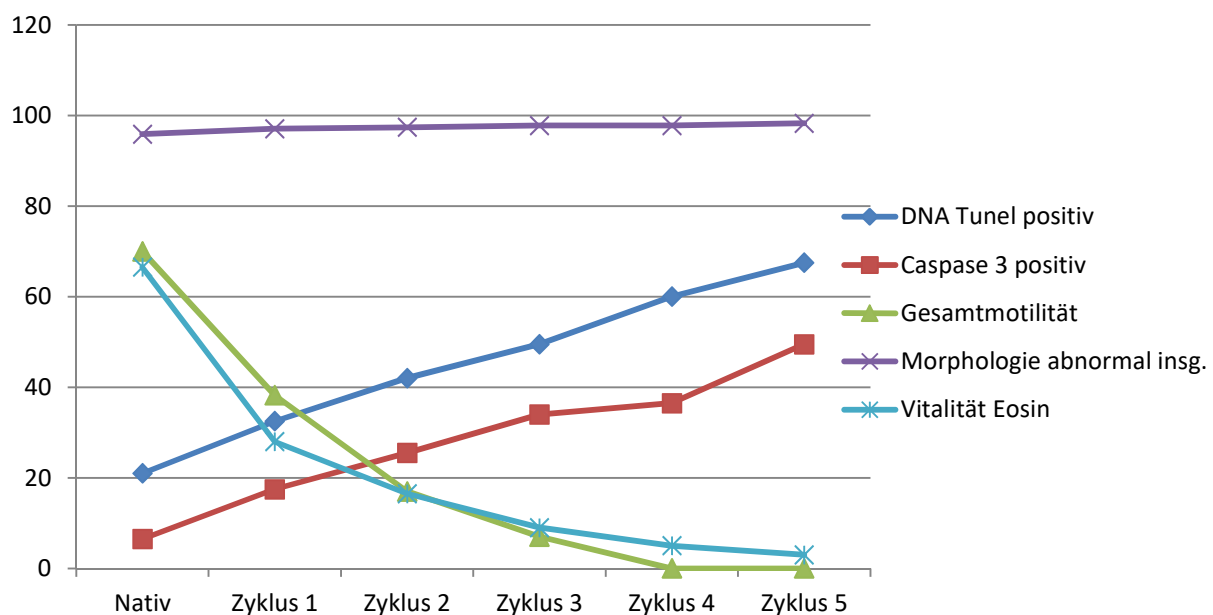


Abbildung 29

Darstellung der Mediane von DNA Tunel positiv, Caspase 3 positiv, Gesamtmotilität, Morphologie abnormal insgesamt und Vitalität (Eosin) im zeitlichen Verlauf von nativ bis Zyklus 5.

5 Diskussion

5.1 Entwicklung der einzelnen Spermienparameter nach Kryokonservierung

Spermien werden durch die Kryokonservierung auf vielfältige Weise geschädigt. Durch die Bildung intrazellulärer oder extrazellulärer Eiskristalle, sowie durch osmotische Effekte kommt es zu einer Schädigung, oder zum Zerreißen der Zellmembran [81]. Außerdem soll das Ausmaß der Schädigung nach Kryokonservierung auch von der Membranfluidität der Spermien abhängen [48]. Zur besseren Evaluierung dieser Konsequenzen, sowie dem Verhalten der Spermien nach Kryokonservierung wurden die Spermien in der vorliegenden Studie mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut. Es ist zu beachten, dass fast alle vergleichbaren Studien lediglich einmal das Ejakulat eingefroren und anschließend aufgetaut haben. In dieser Studie wurde dagegen fünfmal gefroren. Somit konnte ein „Trend“ der Parameter über die Zeit beobachtet werden. Insgesamt wurde das Ejakulat von 40 Probanden untersucht, die alle als fertil einzustufen sind.

Es gibt nur zwei direkt vergleichbare Studien, die ebenfalls das Ejakulat mehrfach eingefroren und aufgetaut haben. Zum einen ist das die Studie von Thomson et al., (2010). Hier wurden die Spermien von 20 Probanden insgesamt dreimal eingefroren und ähnliche Ergebnisse erzielt wie auch in unserer Studie. Es kam zu einer signifikanten Abnahme der Motilität, sowie der Vitalität und zur Zunahme der DNA-Fragmentierung. Sie bemerkten weiterhin, dass ohne Aufbereiten und Waschen des Ejakulats mittels „swim-up“ (= Isolierung der beweglichsten und schnellsten Spermien) bessere Ergebnisse erzielt werden konnten [129]. In der vorliegenden Studie wurden die Spermienproben nicht aufbereitet und es wurde auch nur vor dem ersten Gefriervorgang Kryoprotektiva zugegeben, wie durch Thomson et al., (2010) empfohlen [129]. Die andere Studie ist von Bandularatne et al., (1990). Auch hier wurden die Spermienproben insgesamt dreimal eingefroren, aufgetaut und anschließend ein Abfall der Spermienparameter (Vitalität, Motilität, Morphologie) beobachtet [9].

Die Ergebnisse unserer Studie sollen nachfolgend, aufgelistet nach den einzelnen Spermienparametern, diskutiert werden.

5.1.1 Gesamtspermienzahl

Wie in Tabelle 1 und Abbildung 23 ersichtlich, kam es in der vorliegenden Studie insgesamt zu einer Abnahme der Gesamtspermienzahl über die Zeit hinweg. Die Spermien können durch die Kryokonservierung auf vielfältige Weise geschädigt werden, z.B. durch Verlust des Schwanzes oder Auflösen der Zellmembran [81]. Insgesamt führt das zur Abnahme der Gesamtspermienzahl, da die Spermien so geschädigt werden, dass sie als solche nicht mehr erkannt oder gezählt werden können. Außerdem wurden bei jedem Zyklus auch Ejakulat und die darin enthaltenen Spermien für die Messungen und Versuche entnommen. Des Weiteren kommt es durch Umfüllen zu Verlusten des Probenmaterials (z.B. bei Umfüllen des Ejakulats nach Kryokonservierung von den Straws zurück in ein Kunststoffröhrchen zur weiteren Analyse). Somit ist es nicht verwunderlich, dass es insgesamt zu einer Abnahme der Gesamtspermienzahl kommt. Das Volumen nimmt im ersten Zyklus durch die Beimengung der Gefrierlösung zunächst zu, was gleichzeitig dazu führt, dass die Spermatozoendichte abnimmt. Die Gesamtspermienzahl, die sich aus Multiplikation von Spermatozoendichte und Volumen zusammensetzt, hat daher die beste Aussagekraft über die tatsächliche Anzahl der Spermien.

Der Verlust der Gesamtspermienzahl nach Kryokonservierung, wurde auch in anderen Studien, wie z.B. durch Petym et al., (2014) beschrieben. Sie beobachteten, dass die Gesamtspermienzahl mit und ohne Aufbereitung durch „swim-up“ nach Kryokonservierung signifikant abnimmt [96]. Allerdings konnten laut Petym et al., (2014) für aufbereitete Spermien ein besseres Ergebnis erzielt werden als für Spermien ohne Aufbereitung [96].

Insgesamt kann nach Kryokonservierung von einer Abnahme der Gesamtspermienzahl ausgegangen werden.

5.1.2 Motilität

In dieser Studie konnte eine signifikante Abnahme der Gesamtmotilität beobachtet werden. Außerdem stellt dieser Parameter den wohl „anfälligsten“ im Rahmen der Kryokonservierung dar. Wie in Abbildung 24 (Kapitel 4.1.2) zu sehen, sind im Mittel ab dem vierten Einfrieren weniger als 50 % der Spermien aller Probanden noch beweglich. Beim fünften Zyklus haben lediglich noch sieben Probanden motile Spermien nachzuweisen, wobei diese alle nur stationär beweglich sind. Der Einfluss der Kryokonservierung auf die Motilität ist schon in zahlreichen Studien untersucht worden, die alle eine reduzierte Motilität nach Kryokonservierung feststellen konnten [91] [64] [55] [96]. Durch Schädigung

der mitochondrialen Membran, kann es zur Störung in der Energieversorgung der Spermien mit mangelnder Bereitstellung von ATP für die Fortbewegung kommen [89]. Watson, (1995) war der Ansicht, dass die Motilität einen der am schwersten betroffenen Parameter nach Kryokonservierung darstellt [134].

Nach Zusammenschau unserer Studie mit den anderen zum Vergleich heran gezogen Studien, ist nach Kryokonservierung mit einer signifikanten Abnahme der Motilität zu rechnen.

5.1.3 Vitalität

Die Vitalitätsparameter geben Auskunft über die Lebensfähigkeit der Spermien und sind entscheidend für die Befruchtung der Eizelle. Van der Ven et al., (1986) beschrieben, dass das die Vitalität beschreibende HOS-Testergebnis mehr als andere Parameter (Spermatozoendichte, Motilität, Morphologie) mit einer erfolgreichen in vitro Befruchtung korreliert [133]. Der einfacher durchzuführende Test und deshalb auch von der WHO empfohlen, ist, laut Björndahl et al., (2003) der Eosin-Test [12].

In der vorliegenden Studie wurde die Vitalität mittels HOS-Test und Eosin-Test geprüft. Der Eosin-Test zeigte die Intaktheit der Zellmembran im Kopfbereich. Bei Durchführung des HOS-Test kam es bei intakter semipermeabler Membran zu einer Schwellung des Schwanzes (vergleiche Kapitel 3.3.6). Im Verlauf mehrerer Gefrier- und Auftauvorgänge kam es zur Abnahme der vitalen Spermien, sowohl bei Betrachtung des Eosin-Tests als auch in Hinsicht auf den HOS-Test. Hossain et al., (2010) bemerkten, dass sich die Spermien in beiden Tests (Vitalitätstest mit Farbe und HOS) ähnlich verhalten, sie rieten jedoch trotzdem dazu beide Tests zu verwenden um die Vitalität zu beschreiben [58]. Aufgrund der abnehmenden Spermienzahl und der durch die Verdünnung bedingt nur schwer durchführbaren Testung durch den HOS, wurde dieser in der vorliegenden Studie nur nativ und nach dem ersten Gefriervorgang durchgeführt. Hier konnte man eine analoge Abnahme der Vitalität wie beim Eosin-Test nach Kryokonservierung beobachten. Bei Betrachtung des Eosin Tests kam es zur starken Abnahme von nativ 66,5 % auf 3 % vitale Spermien (im Mittel) nach dem letzten Gefrierzyklus (siehe Tabelle 1 und Abbildung 25, Kapitel 4.1.3). Die HOS-positiven, vitalen Spermien nahmen von nativ 76,06 % auf 47,2 % nach dem ersten Gefriervorgang ab (siehe Tabelle 1 und Kapitel 4.1.3).

Auch Ozkavukcu et al., (2008) [91], M. E. Hammad et al., (2001) [54] und Mitchell et al., (2011) [78] konnten in ihren Studien eine Abnahme der Spermiovitalität nach Kryokonservierung beobachten.

Insgesamt kann man von einer signifikanten Abnahme der Vitalität (gemessen durch Eosinfärbung und HOS-Test) nach Kryokonservierung sprechen.

5.1.4 Morphologie

Es gibt unterschiedliche Arten der Malformation von Spermien. Diese sind oft auf Defekte während der Spermio-genese zurückzuführen oder manchmal auch auf Pathologien im Bereich des Nebenhodens. Beispielsweise kann das Auftreten von aufgerollten Spermien-schwänzen auf eine Pathologie des Nebenhodens hindeuten [95]. Allgemein kann gesagt werden, dass eine veränderte Morphologie häufig mit einem erniedrigten Fertilitätspotential einhergeht. Manche Defekte können sich auch negativ auf die DNA auswirken, so wurde z.B. schon im Zusammenhang mit einer abnormalen Morphologie ein Anstieg der DNA-Fragmentierung [44] oder eine strukturelle Chromosomenaberration [68] in Verbindung gebracht. Eine normale Morphologie, vor allem aber eine intakte Morphologie des Spermienkopfes, korreliert mit der Rate an erfolgreichen Befruchtungen in der assistierten Reproduktion [37].

In der vorliegenden Studie kam es nach den fünf unternommenen Gefriervorgängen zu einer leichten Zunahme abnorm geformter Spermien insgesamt. Die einzelnen Untersuchungsergebnisse von „Abnormality of head“, „Abnormality of tail“ und „Abnormality of midpiece“ bestätigen dies allerdings nicht. Betrachtet man die einzelnen morphologischen Parameter, so ist kein wirklicher „Trend“ über die fünf Gefriervorgänge hinweg zu erkennen. Dies könnte daran liegen, dass auch einige vorher schon teilweise geschädigten Spermien einfach im Rahmen der Kryokonservierung und der damit einhergehenden Eiskristallbildung komplett zerstört wurden und somit gar nicht mehr einzeln erfasst wurden. So kommt es zu Schwankungen der Messergebnisse und keinem wirklichen „Trend“ bei der Betrachtung der einzelnen Morphologie von Kopf, Mittelteil und Schwanz. Außerdem muss bedacht werden, dass bei jeder Analyse immer nur ein ganz kleiner Teilausschnitt des Ejakulats untersucht werden kann. Dadurch kann sich die Zahl der einzelnen amorphen Spermienabschnitte wie Kopf, Mittelteil und Schwanz auch ändern.

Andere Studien konnten ebenfalls zeigen, dass die Morphologie im Zuge der Kryokonservierung geschädigt wird. Donelley et al., (2001) beschrieben, dass es durch die

Kryokonservierung zu einer signifikanten Schädigung der Morphologie kommt, sowohl bei fertilen als auch infertilen Patienten [35]. Auch Ozkavukcu et al., (2008) konnten nach Kryokonservierung eine Zunahme abnorm geformter Spermien feststellen. Es kam zu zunehmenden Veränderungen des Akrosoms, zu subakrosomaler Schwellung, aber auch zu Schädigungen in der Spermienschwanz-Region nach Kryokonservierung [91].

Prinzipiell gesehen ist die Spermienmorphologie vorbestimmt und wird durch den genetischen Code jedes Einzelnen geprägt. Die letztliche Form, insbesondere des Spermienkopfes ist sowohl von der Chromatinkondensation während der Spermatogenese, als auch von einer genau abgestimmten Organisation der DNA im Spermienkopf abhängig [42]. Trotzdem scheint die Morphologie insgesamt von der Kryokonservierung negativ beeinflusst zu werden, wie unsere und auch andere Studienergebnisse zeigen konnten. Denn auch wenn in der vorliegenden Studie bei Betrachtung der einzelnen morphologischen Schäden an Kopf, Mittelstück und Schwanz kein klarer „Trend“ zu erkennen ist, so ist insgesamt doch von einer leichten Zunahme der amorphen Spermien auszugehen.

5.1.5 Peroxidase

Der Peroxidase-Test und damit die Ermittlung der Leukozytenzahl wurden nur nativ durchgeführt. Sie stellt einen Parameter dar, der von Anfang an definiert im Ejakulat vorliegt und sich nicht durch die Kryokonservierung beeinflussen lässt. Allgemein kann eine stark erhöhte Anzahl von Leukozyten auf eine Infektion und auch auf eine erniedrigte Spermienqualität hinweisen [138]. Es ist außerdem zu beachten, dass das Nichtvorhandensein von Leukozyten im gewählten Ausschnitt, nicht zwangsläufig auch bedeutet, dass im restlichen Ejakulat keine Leukozyten vorhanden sind [138].

Leukozyten sind neben unreifen, manchmal abnorm geformten Spermatozoen, und Umwelteinflüssen, wie z.B. Rauchen [65] die größte Quelle für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im menschlichen Ejakulat [1]. Ein erhöhtes Vorkommen von ROS wiederum ist neben einer erniedrigten Motilitätsrate [138] auch mit einer geringeren Gesamtspermienzahl assoziiert [8]. Der durch die ROS entstehende oxidative Stress kann auch die DNA Integrität negativ beeinflussen [138]. So konnten Fariello et al., (2009) bei Leukozytospemie eine erhöhte Rate an DNA-Fragmentierung nachweisen [39]. Des Weiteren kann es durch den Einfluss von ROS zu einer Dysfunktion der Spermien und einer erhöhten Rate an Apoptose kommen, sowie zu einem schlechterem Ergebnis der assistierten Reproduktion und somit auch einer geringeren Rate an Geburten. Außerdem können reaktive Sauerstoffspezies zu

Strangbrüchen der mitochondrialen DNA führen [2]. Dies hängt v.a. damit zusammen, dass die Zellmembranen der Spermien reich an ungesättigten Fettsäuren sind. Die ROS führen zur Lipidperoxidation, wobei reaktive Radikale Elektronen der Lipide aufnehmen und es so zur Membranschädigung und letztendlich zum Tod der Spermien kommen kann [1]. Auch im Rahmen der Kryokonservierung kommt es zu erhöhtem oxidativen Stress für die Spermien. Thomson et al., (2009) gehen in ihrem Artikel in der „Human Reproduction“ sogar soweit, dass sie den oxidativen Stress hauptsächlich für die Beschädigung der DNA verantwortlich machen [128]. Sie konnten nachweisen, dass es durch die Zugabe von antioxidant wirkendem Genistein zu einer deutlichen Abnahme der DNA-Fragmentierung kommt [128]. In der vorliegenden Studie lag bei keinem der Probanden ein erhöhter Anteil an Leukozyten vor. Der negative Einfluss durch Leukozyten entstandene reaktive Sauerstoffspezies kann also in dieser Studie vernachlässigt werden.

5.1.6 MAR

Der MAR-Test wurde in der vorliegenden Studie nur nativ durchgeführt. Der Grenzwert mit Beeinflussung der Spermienqualität liegt bei 50 % Agglutination (siehe Anhang 1). Alle Probanden zeigten nativ weniger als 41 % Agglutination, der Median lag bei 5,75 % agglutinierten Spermien. Der MAR Test weist Antikörper auf der Spermienoberfläche nach, deren Anteil gewissermaßen „vorbestimmt“ ist (siehe Kapitel 3.3.9). Der Test wurde nur nativ durchgeführt, da in dieser Studie davon ausgegangen wurde, dass die Anzahl von bestehenden Antikörpern auch im Verlauf mehrerer Gefriervorgänge anteilmäßig gleichbleibt.

5.1.7 DNA Tunel positiv

Durch den DNA Tunel Test werden Spermien mit DNA-Strangbrüchen identifiziert (siehe Kapitel 3.4.1.1). Simon et al., (2014) wiesen nach, dass es bei der Befruchtung durch Spermien mit DNA-Schäden zu einer schlechten Embryonenentwicklung kommen kann [121]. Auch Borini et al., (2006) stützen diese These. Sie wiesen nach, dass es bei erhöhter DNA-Fragmentierung zu einer schlechteren Überlebensrate von implantierten Embryonen, mit erhöhter Rate an Schwangerschaftsabbrüchen bei ICSI Patienten kommt [13].

In der vorliegenden Studie kam es im Rahmen der Kryokonservierung zur konstanten Zunahme der DNA-Strangbrüche. Im Mittel lag der Anteil der Tunel positiven Spermien nativ bei 22,04 % und nach dem letzten Einfrieren bei 67,58 % (siehe Tabelle 1). Der native,

mittlere Anteil der DNA-fragmentierten Spermien liegt damit in einem vergleichbaren Bereich mit anderen Studienergebnissen für fertile Probanden. Beispielsweise hatten in einer Studie von Sharma et al., (2010) fertile Probanden eine mittlere DNA-Fragmentierung von 19,25 % [115]. Auch in einer neueren Studie von Sharma et al., (2016) wies die fertile Kontrollgruppe im Mittel eine DNA-Fragmentierung von 19,6 % auf, gemessen mittels Tunel Test. Die infertile Vergleichsgruppe lag bei 68,9 % [114]. Der Wert der infertilen Patientengruppe liegt in einem ähnlichen Bereich, wie das in der vorliegenden Studie erzielte Testergebnis nach dem fünften Gefrierzyklus (67,58 %).

Es gilt als erwiesen, dass bei infertilen Patienten ein höherer Anteil fragmentierter DNA vorliegt, als bei Patienten mit gesicherter Fertilität [112] [100]. Außerdem hat die normal ablaufende, intakte Spermiogenese Einfluss auf den Anteil der Spermien mit fragmentierter DNA. So liegt bei Fehlern der Spermiogenese ein erhöhter Anteil an DNA-Fragmentierung vor [122]. Den negativen Einfluss der Kryokonservierung auf die DNA-Integrität von infertilen Probanden beschrieben Donnelly et al., (2001) [35], sowie Mitchell et al., (2011) [78]. Auch Thompson et al., (2009) konnten eine Zunahme der DNA-Fragmentierung nach einmaliger Kryokonservierung nachweisen [128].

Insgesamt ist nach Zusammenschau anderer Studienergebnisse, sowie den Testergebnissen aus der vorliegenden Studie von einer Zunahme der DNA-Fragmentierung nach Kryokonservierung auszugehen.

5.1.8 Caspase 3 positiv

Die Caspase 3 ist Marker der mitochondrialen Apoptose (siehe Kapitel 2.3.2). Laut einer Studie von May-Panloup et al., (2003) kommt es bei vorliegenden Anomalitäten oder Dysfunktion der mtDNA gehäuft zu einer schlechten Spermienqualität und damit einhergehender Unfruchtbarkeit [74].

In der vorliegenden Studie nimmt die Apoptoserate (gemessen durch Caspase 3), im Verlauf der fünf Gefrier- und Auftauzyklen, zu. Im Mittel kam es zu einem ähnlich deutlichen Anstieg wie zuvor beim Tunel Test, von nativ 7,8 % auf 45,25 % nach dem letzten Gefriervorgang (siehe Tabelle 1). Ausgangspunkt der durch Caspase 3 vermittelten Apoptose stellen die Mitochondrien dar [146]. Das zunehmende Vorkommen mitochondrial vermittelter Apoptose nach Kryokonservierung, gemessen durch den Anstieg an Caspase 3, konnten bereits Thomson et al., (2009) in ihrer Studie nachweisen [128]. Auch Paasch et al., (2004) konnten eine vermehrte Aktivierung von Caspase 3, 8 und 9 sowie eine Störung des

Membranpotentials der Mitochondrien nach Kryokonservierung feststellen [92]. Die Apoptoseprozesse der Spermien spielen auch eine entscheidende Rolle in der Kapazitation der Eizelle. Laut Grunewald et al., (2009) scheint es bei ablaufender Kapazitation nämlich gleichzeitig zur Inaktivierung der Apoptosesignalwege zu kommen [50].

In Zusammenschau der Ergebnisse kommt es nach Kryokonservierung zur Zunahme der mitochondrialen, durch Caspase 3 vermittelten, Apoptose.

5.1.9 pH und Viskosität

Die pH-Bestimmung lässt einen Rückschluss auf die Zusammensetzung der Spermienflüssigkeit zu. So wird der saure Anteil hauptsächlich in der Prostata produziert, wohingegen der basische Anteil vor allem in den Samenbläschen entsteht. Dieser macht mit ca. 70% den größten Teil des Ejakulats aus und bildet dabei einen Gegenpol zu dem sauren Scheidenmilieu. Somit sind die Spermien „geschützt“ und es wird eine bessere Fortbewegung möglich [110]. Weiterhin ist ein konstanter pH sehr wichtig, um die intrazelluläre Homöostase aufrecht zu halten. Sowohl der zelluläre Metabolismus als auch die Proteinsynthese und die regelrechte Funktion der Mitochondrien sind anfällig für pH-Verschiebungen. Ein abnormer pH-Wert kann also auch mit einem gestörten Zellmetabolismus der Spermien einhergehen [1].

In der vorliegenden Studie wurde der pH nativ bestimmt und alle Probanden lagen mit pH-Werten von 8 bis 10 im leicht basischen Milieu (vergleiche Kapitel 4.1.8). Zhou et al., (2015) untersuchten den Einfluss des pH-Wertes auf die Spermienparameter. Sie fanden heraus, dass es durch einen leicht alkalischen pH zu einer Potenzierung der Motilität und Kapazitation kommt, wohingegen ein saurer pH von 6,2 oder kleiner im Seminalplasma mit einer Abnahme der Motilität, Vitalität und auch Befruchtungsfähigkeit der Spermien einhergehen kann [145]. Zhou et al., (2015) vermuteten als Ursache eine verminderte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase im saurem Milieu [145]. Al-Khanak et al., (1985) untersuchten den Einfluss verschiedener Temperaturen auf den pH der Spermien, konnten dabei aber keinen statistisch signifikanten Zusammenhang oder eine Änderung durch Kryokonservierung feststellen [4].

Insgesamt ist also nur bei einer Verschiebung des pHs in den sauren Bereich mit einer negativen Beeinflussung der anderen Spermienparameter zu rechnen. Da alle pH-Werte in der vorliegenden Studie im leicht basischen Bereich lagen, ist von keiner Beeinflussung der anderen Spermienparameter durch den pH auszugehen.

Auch eine sehr hohe Viskosität kann negativen Einfluss auf die anderen Spermienparameter wie Motilität, Spermatozoendichte und das Ergebnis des MAR-Tests haben [138]. In der vorliegenden Studie wurde bei 14 Probanden ein stark visköses Ejakulat festgestellt. Die restlichen 26 Probanden zeigten eine normale oder leichte Viskosität (siehe Kapitel 4.1.9). Nach der nativen Bestimmung der Parameter wurden die Proben mit Kryokonservierungslösung vermengt. Diese führte wiederum bei allen Proben zu einer geringeren Viskosität und erlaubte so die bessere Verarbeitung für die anschließenden Versuchsreihen nach der Kryokonservierung.

Elia et al., (2009) stellten fest, dass v.a. die Motilität der Spermien durch zu hohe Viskosität negativ beeinflusst wird und auch allgemein mit einer erhöhten Viskosität des Ejakulats häufiger eine Subfertilität vergesellschaftet ist [38]. Die Hyperviskosität kann vielfältige Ursachen haben, beispielsweise Infektionen, enzymatische oder genetische Faktoren [38]. Laut Al-Khanak et al., (1985) wird die Viskosität des Seminalplasmas nicht von der Kryokonservierung beeinflusst, sodass es trotz Gefrieren nicht zu einem Verlust der schützenden Wirkung auf die Spermien kommt [4].

In der vorliegenden Studie konnte nicht festgestellt werden, dass es durch die erhöhte Viskosität der 14 Probanden zu einer erniedrigten Motilität oder zu Subfertilität kommt. Alle Probanden wurden nativ als fertil eingestuft und auch der Anteil der motilen Spermien war nativ bei allen Probanden normwertig (Kapitel 4.1.2).

5.1.10 Alter

Es ist bekannt, dass das Alter der Frau Einfluss auf die erfolgreiche Fertilisation und anschließende Schwangerschaft hat, doch auch das männliche Alter spielt eine Rolle in der Entwicklung hoch-qualitativer Embryonen [140]. Es kommt laut einer Studie von Moskovtsev et al., (2006) bei Männern mit 45 Jahren oder älter zu erhöhter DNA-Fragmentierung [80]. Dies konnten auch Zorn et al., (2012) in ihrer Studie nachweisen. Sie stellten eine Korrelation zwischen dem Alter und einer erhöhten Denaturierung der DNA bei Spermien fest [149]. Grund dafür könnte unter anderem auch der erhöhte Anteil von reaktiven Sauerstoffspezies im Seminalplasma älterer Männer (und damit reduzierten Spermienqualität wie in Kapitel 5.1.5 beschrieben) darstellen [29]. In einer Studie von Plas et al., (2000) forderte man sogar dazu auf, dass das väterliche Alter bei Befruchtung 50 Jahre nicht übersteigen sollte [97]. Es komme mit zunehmenden Alter nicht nur zu erniedrigten Testosteronspiegeln und damit negativen Einfluss auf die Spermatogenese, sondern auch zu einem erhöhtem Risiko

autosomal dominant vererbter Erkrankungen aufgrund der Zunahme von strukturellen Chromosomenanomalien mit dem Alter [97]. Auch die DNA-Methylierung nimmt mit dem Alter zu, wie Jenkins et al., (2012) in ihrer Studie erläuterten [61].

In der vorliegenden Studie lag das Alter der Probanden im Durchschnitt bei 23 Jahren, wobei nur 3 Probanden über 30 Jahre teilnahmen und davon der älteste Proband 44 Jahre alt war. Dies könnte einer der Gründe sein, warum bei allen Probanden allgemein gute Testergebnisse erzielt wurden und somit alle als fertil einzustufen sind.

5.1.11 BMI

Der BMI der Patienten und seine Auswirkungen auf die Fertilisation wurden in den vergangenen Jahren immer mehr in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Es wird vermutet, dass Übergewicht bzw. ein erhöhter BMI und das Alter einen negativen Einfluss auf die Embryonenqualität, die Ergebnisse der assistierten Reproduktion und somit auch auf die Schwangerschaftsraten haben [5]. Wobei kontroverse Meinungen im Hinblick auf die Beeinflussung einzelnen Spermienparameter bestehen. So dementierten Macdonald et al., (2013) einen Zusammenhang der Spermienparameter mit dem BMI [71]. Im Gegensatz dazu beschrieben Fariello et al., (2012) eine Korrelation zwischen erhöhter DNA-Fragmentierung, sowie erniedrigter mitochondrialer Aktivität der Spermien und einem erhöhten BMI der Patienten [40]. Alles in allem ist die Bedeutung des BMIs auf die verschiedenen Spermienparameter, sowie auf die Spermatogenese noch nicht abschließend geklärt.

In der vorliegenden Studie lagen die Probanden auch bei Berechnung des Body-Mass-Index weitestgehend (65 %) im normalgewichtigen Bereich zwischen 20 bis 25 m²/kg. Vier Probanden waren leicht untergewichtig und zehn Probanden hatten einen BMI von größer als 25 m²/kg. Es soll darauf hingewiesen werden, dass in dieser Studie nicht der Hüftumfang oder ähnliche über eine Adipositas aussagekräftige Werte zusätzlich bestimmt wurden. Da es sich fast ausschließlich um junge, sportliche Probanden handelte, ist ein erhöhter BMI also auch nicht zwangsläufig mit einer Adipositas gleichzusetzen, sondern oft auch Resultat eines erhöhten Muskelanteils.

5.2 Assoziation der einzelnen Parameter

5.2.1 Gesamtmotilität

Laut vorliegender Studie besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Gesamtmotilität und Gesamtspermienzahl, Vitalität, abnormen Morphologie, dem Testergebnis des DNA Tunel positiv und Caspase 3 positiv, sowie dem BMI. Die einzelnen Zusammenhänge sind in Tabelle 3 im Ergebnisteil (Kapitel 4.2.1) aufgelistet.

Studien die sich bereits vorher explizit mit der Korrelation zwischen Gesamtmotilität und Gesamtspermienzahl, Vitalität oder auch dem Ergebnis des MAR-Tests beschäftigt haben, konnten leider nicht ausfindig gemacht werden. Laut der vorliegenden Studie besteht allerdings ein statistisch signifikanter, positiver Zusammenhang der Gesamtmotilität mit der Gesamtspermienzahl und der Spermiovitalität gemessen mittels HOS-Test und Eosin Färbung. Zwischen den vorkommenden Spermientikörpern ermittelt durch den MAR-Test und der Motilität ergab sich in dieser Studie keine Korrelation über die Zeit hinweg.

Es zeigte sich ein negativer Zusammenhang zwischen Motilität und abnormaler Morphologie der Spermien. So kommt es nach mehreren Gefrier- und Auftauvorgängen zu einer Abnahme der Motilität während die abnormale Morphologie zunimmt (siehe auch Tabelle 1 und 3). Zu gleichen Ergebnissen kamen bereits Parinaud et al., (1996) die eine hohe positive Korrelation zwischen einer normaler Spermienmorphologie und der progressiven Motilität nachweisen konnten [94].

Es konnte in der vorliegenden Studie auch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Spermienmotilität und der DNA-Fragmentierung (gemessen durch den Tunel Test) gezeigt werden. Bei Abnahme der Gesamtmotilität kam es gleichzeitig zur Zunahme der fragmentierten DNA. Auch Varghese et al., (2009) beobachteten eine positive Korrelation zwischen der Spermienmotilität und deren DNA-Integrität [130]. Ebenso konnten Borini et al., (2006) eine negative Korrelation zwischen der Spermienmotilität und der DNA-Fragmentierung nachweisen [13].

Ähnlich verhält es sich bei Betrachtung der Caspase 3 positiven Spermien. Es kommt bei Abnahme der Gesamtmotilität, im Verlauf der Gefriervorgänge, zur Zunahme der Caspase 3 positiven Spermien. Ebenso beschrieben auch Said et al., (2004) in ihrem Artikel das Auftreten aktivierter Caspase 3 und eine damit einhergehende erhöhte Immotilität der Spermien [106]. O'Connell et al., (2002) postulierten, dass die Motilität auch maßgeblich von der mitochondrialen Funktion abhängig sei. Da die Mitochondrien der Hauptproduzent von

oxidativer Energie und somit Bereitsteller von ATP für die Fortbewegung der Spermien sind [89]. So kann durch die Schädigung der mitochondrialen Membranen im Rahmen der Kryokonservierung zum einen nicht mehr genügend ATP für die Fortbewegung der Spermien produziert werden, zum anderen wird dadurch auch die intrinsische Apoptose-Kaskade (siehe Kapitel 2.3.2) in Gang gesetzt [89]. Donnelly et al., (2000) beobachteten ebenfalls eine negative Korrelation zwischen mitochondrialer Dysfunktion und Motilität der Spermien [34]. In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden und der Gesamtmotilität beobachtet werden. Auch Brahem et al., (2011) untersuchten den Einfluss des Alters auf andere Spermienparameter: In der Studie zeigte sich bei erhöhtem Probandenalter eine Abnahme der Vitalität. Gleichzeitig konnten sie keinen Zusammenhang zwischen dem Probandenalter und der Spermienmotilität oder DNA-Fragmentierung feststellen [15]. Winkle et al., (2009) konnten in ihrer Studie mit 320 Probanden allerdings einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und der Gesamtmotilität nachweisen. So hatten ältere Patienten im Schnitt weniger motile Spermien als Jüngere [137]. Um eine abschließende Aussage über die Beeinflussung der Gesamtmotilität durch das Alter zu treffen, sind wohl noch weitere Studien nötig.

Zu einem statistisch signifikanten Zusammenhang kam es in der vorliegenden Studie bei Betrachtung von Gesamtmotilität und BMI. Ist der BMI um den Wert 1 erhöht, so kam es im zeitlichen Verlauf der fünf Gefriervorgänge zu einem erhöhten Anteil der Gesamtmotilität von 0,65 % (siehe Tabelle 3, Kapitel 4.2.1). Bei Betrachtung der Literatur zeigen sich hierzu gegenteilige und auch neutrale Ergebnisse. In der Studie von Fariello et al., (2012) konnte ein negativer Zusammenhang zwischen dem BMI der Patienten und der Spermienmotilität beobachtet werden. So hatten Normalgewichtige einen signifikant höheren Anteil an Spermien mit progressiver Motilität im Vergleich zu übergewichtigen Patienten [40]. Macdonald et al., (2013) veröffentlichten ähnliche Ergebnisse [71]. Grund hierfür könnte auch die eingeschränkte mitochondriale Aktivität bei Patienten mit erhöhtem BMI sein [40]. Es gibt allerdings auch neutrale Studien, die überhaupt keine Korrelation zwischen Spermienmotilität und BMI feststellen konnten, wie beispielsweise Eisenberg et al., (2014) die die Studienergebnisse von insgesamt 486 Probanden veröffentlichten [36]. In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass Probanden mit einem höheren BMI im Verlauf der Gefriervorgänge mehr motile Spermien aufweisen. Das würde bedeuten, dass ein erhöhter BMI im Hinblick auf die Motilität protektiv entgegen der Schädigung durch

Kryokonservierung wirken könnte. Der Grund für diese Studienergebnisse könnte die Tatsache darstellen, dass die Probanden mit erhöhtem BMI nicht zwangsläufig auch als adipös zu betrachten sind. Wie bereits in Kapitel 5.1.11 diskutiert, handelte es sich um sportliche Probanden deren BMI auch Resultat eines erhöhten Muskelanteils war. Es wurde leider kein Taillenumfang oder Körperfettanteil bestimmt. Demzufolge ist der in unserer Studie ermittelte positive Zusammenhang zwischen Spermienmotilität und BMI kritisch zu hinterfragen.

Insgesamt zeigte die Gesamtmotilität einen positiven Zusammenhang mit der Gesamtspermienzahl und der Vitalität (gemessen durch Eosin- und HOS-Test). Ebenso konnte ein negativer Zusammenhang zwischen Motilität und der abnormalen Morphologie, der DNA-Fragmentierung, sowie der durch Caspase 3 vermittelten Apoptose beobachtet werden. Der in der vorliegenden Studie ermittelte positive Zusammenhang zwischen BMI und Motilität ist fragwürdig und wahrscheinlich der vorliegenden Probandenpopulation geschuldet.

5.2.2 Vitalität (Eosin)

Die Vitalität der Spermien stellt einen entscheidenden Faktor in der erfolgreichen Befruchtung der Eizelle dar. Dies wurde bereits durch Jeyendran et al., (1984) beobachtet, die ein Anschwellen der Spermien im HOS-Test und somit eine intakte semipermeable Zellmembran mit einer erhöhten Rate an erfolgreichen in-vitro Befruchtungen in Verbindung brachten [62].

Es konnte leider keine andere Studie gefunden werden, die explizit eine Korrelation von Vitalität und den Parametern Gesamtspermienzahl, Motilität und Morphologie untersucht.

In der vorliegenden Studie konnte keine Assoziation zwischen Vitalität und Gesamtspermienzahl festgestellt werden. Jedoch bestand ein signifikanter, positiver Zusammenhang zwischen Spermiovitalität gemessen durch den Eosin-Test mit der Gesamtmotilität und der abnormalen Morphologie. Auch mit dem Testergebnis des HOS-Tests besteht ein Zusammenhang.

In der vorliegenden Studie kann leider keine Aussage zu einer möglichen Abhängigkeit der Vitalität von der DNA-Fragmentierung oder der Expression der Caspase 3 in Spermien getroffen werden. Die Werte konnten im SPSS nicht ermittelt werden. Es gab in der Vergangenheit aber Studien die einen Zusammenhang zwischen Vitalität und der DNA-Fragmentierung untersuchten. Wie Mitchell et al., (2011), die eine starke positive

Korrelation der DNA-Integrität mit der Spermiovitalität nachweisen konnten [78]. Auch Samplaski et al., (2015) zeigten in ihrem Artikel den starken Zusammenhang zwischen Vitalität und DNA-Integrität [108]. Sie stellten fest, dass ein erhöhter Anteil avitaler Spermien mit einer vermehrten DNA-Fragmentierung einhergeht. Sie geben dabei zu bedenken, dass es nicht endgültig geklärt ist, welcher der beiden Prozesse (Avitalität oder DNA-Fragmentierung) hierbei wohl zuerst auftritt [108].

In der vorliegenden Studie konnte keine Assoziation der Spermiovitalität mit dem Alter oder dem BMI der Probanden nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu beschrieben Brahem et al., (2011) eine Abnahme der Spermiovitalität bei zunehmenden Patientenalter [15]. Auch in der Studie von Zorn et al., (2012) konnte nachgewiesen werden, dass zwischen der Vitalität der Spermien und sowohl dem Alter, als auch dem BMI des Patienten eine negative Korrelation besteht [149]. Eisenberg et al., (2014) dementierten allerdings eine Korrelation zwischen BMI und Spermiovitalität, da sie in ihrer Studie keinen Zusammenhang nachweisen konnten [36]. Aufgrund der kontroversen Studienergebnisse ist hier keine abschließende Aussage zu treffen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zwischen Spermiovitalität und Motilität eine positive Assoziation besteht, wohingegen zwischen Vitalität und abnormaler Morphologie eine negative Assoziation ermittelt werden konnte.

5.2.3 Abnormale Morphologie

Insgesamt gilt eine normale Morphologie als prognostisch günstig für eine erfolgreiche Befruchtung, wie Vawda et al., (1996) in ihrem Artikel beschreiben [131]. Weiterhin beschrieben Chemes et al., (2003) die Einwirkung verschiedener Abnormalitäten auf die erfolgreiche Fertilisation. So sollen amorphe Geißeln prognostisch günstiger sein, als Defekte des Akrosoms oder im Mittelstück der Spermien [26].

In der vorliegenden Studie ist die Morphologie unabhängig von Gesamtspermienzahl und auch dem Antikörpertest MAR. Dafür besteht ein Zusammenhang zwischen Spermienmorphologie und Motilität, Vitalität, DNA-Fragmentierung, sowie der (durch Caspase 3 vermittelten) Apoptose.

Es kam in der vorliegenden Studie zu einer negativen Assoziation zwischen amorph geformten Spermien und dem Anteil motiler Spermien. Auch Parinaud et al., (1996) konnten in ihrer Studie eine hohe positive Korrelation zwischen einer normaler Spermienmorphologie und der progressiven Motilität nachweisen [94].

Im Hinblick auf die Vitalität ist keine klare Aussage zu machen, denn es besteht laut der vorliegenden Studie ein Zusammenhang mit dem Ergebnis des Eosin-Tests, aber nicht mit dem HOS-Test. Betrachtet man den Eosin-Test allerdings als Repräsentant einer intakten Spermienmembran im Kopfbereich und den HOS-Test als aussagekräftigen Test der semipermeablen Membran im Schwanzbereich, so kann man gegebenenfalls vermuten, dass ein Verlust der Membranintaktheit im Spermienkopf die Morphologie beeinflusst, Veränderungen im Schwanzbereich aber keinen Einfluss auf die Morphologie nehmen.

Eine bessere Aussage kann zu einer möglichen Assoziation von Morphologie und DNA-Fragmentierung (gemessen durch den Tunel Test) gemacht werden. In den vorliegenden Studienergebnissen führt ein Anstieg der Tunel positiven Spermien um 1 %, im Verlauf mehrerer Gefrier- und Auftauprozesse, auch zu einem Anstieg der abnormen Spermienmorphologie um 0,04 % (siehe Tabelle 5, Kapitel 4.2.3). Ein Anstieg von 0,04 % ist zwar nur sehr gering, dennoch scheint ein Zusammenhang zu bestehen. Betrachtet man die vorhandene Literatur, so stellt man fest, dass hier viele unterschiedliche Forschungsergebnisse publiziert wurden. Silva et al., (2015) konnten ebenfalls eine Korrelation zwischen Morphologie und intakter DNA feststellen [120]. Sie fanden insbesondere einen erhöhten Anteil amorpher Spermienköpfe bei gleichzeitig erhöhter DNA Fragmentierung der Spermien [120]. Auch Varghese et al., (2009) beschrieben einen Zusammenhang zwischen normaler Morphologie, insbesondere des Spermienkopfes und der DNA Integrität: Sie fanden bei Spermien mit einem höheren Anteil morphologisch normaler Spermien auch weniger DNA-Defekte [130]. Mangiarini et al., (2013) vermuteten sogar einen Zusammenhang zwischen spezifischen morphologischen Defekten der Spermien und dem Anteil an fragmentierter DNA [73]. Im Gegensatz dazu konnten Donelly et al., (2001) keinen Zusammenhang zwischen Morphologie und DNA-Integrität, sowohl bei fertilen als auch bei infertilen Patienten feststellen [35]. Weiterhin zeigte sich keine Korrelation abnormaler Spermienköpfe mit der DNA-Integrität selbiger Spermien, was sie zu der Annahme führte, dass Phänotyp und Genotyp der Spermien nicht gleichermaßen von der Kryokonservierung betroffen sind [35]. In der Zusammenschau und auch unter Beachtung der Forschungsergebnisse der vorliegenden Studie ist wahrscheinlich trotzdem von einer Korrelation auszugehen.

Eine Assoziation zeigte sich in der vorliegenden Studie auch zwischen der abnormalen Morphologie und dem Testergebnis des Caspase 3 Tests. Beim Anstieg der Caspase 3

positiven Spermien um 1 % ist, über die Zeit der Gefriervorgänge hinweg, mit einer mittleren Zunahme der abnormen Morphologie um 0,05 % zu rechnen (siehe Tabelle 5, Kapitel 4.2.3). Es fanden sich leider keine vergleichbaren Studien, die vorher schon eine Korrelation zwischen Spermienmorphologie und Apoptose vermittelt durch Caspase 3 untersucht haben. In der vorliegenden Studie bestand keine Abhängigkeit der Spermienmorphologie vom Alter oder BMI der Probanden (siehe Tabelle 5, Kapitel 4.2.3). Im Hinblick auf das Alter der Probanden konnte auch in vorhergehenden Studien kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Spermienmorphologie nachgewiesen werden [137] [15]. Auch Eisenberg et al., (2014) konnten keine statistisch signifikante Korrelation von Spermienmorphologie und BMI nachweisen [36]. Dagegen stellten Macdonald et al., (2013) eine schwache Korrelation zwischen BMI und der Spermienmorphologie fest [71]. Weitere Studien sind nötig um einen möglichen Einfluss von Alter und BMI auf die Spermienmorphologie zu prüfen.

Insgesamt kann von einer negativen Assoziation zwischen abnormaler Morphologie und Spermienmotilität ausgegangen werden. Außerdem besteht eine positive Assoziation zwischen dem Anteil amorpher Spermien und DNA-Fragmentation, sowie mitochondrialer Apoptose.

5.2.4 DNA Tunel positiv

Die Bestimmung der DNA-Fragmentierung durch den Tunel Test stellt einen validen und wichtigen Test im Hinblick auf die Fortpflanzungsfähigkeit dar [27]. Es besteht eine hohe Korrelation zwischen DNA-Integrität und erfolgreicher Fertilisation [21]. Nichtsdestotrotz konnten Gandini et al., (2004) das Eintreten von Schwangerschaften und anschließend normaler Geburten, trotz hohem Anteil an DNA-Fragmentierung im Patientenejakulat, dokumentieren [45].

In der vorliegenden Studie zeigte sich das Ergebnis des Tunel Tests abhängig von der Gesamtspermienzahl, der Motilität, der Vitalität, der abnormalen Morphologie, dem Anteil an Caspase 3 positiven Spermien, sowie vom Alter der Probanden.

Die Abhängigkeit der DNA-Fragmentierung von verschiedenen Spermienparameter wurde schon in zahlreichen vorhergehenden Studien untersucht. So konnten beispielsweise Dobrzynska et al., (2010) eine Korrelation von erniedrigter Spermatozoendichte und erhöhtem Anteil an DNA Schäden gemessen mit dem Comet Assay beobachten [33]. Den gleichen Zusammenhang konnten auch Borini et al., (2006) nachweisen, wobei diese die

DNA-Fragmentierung mit dem Tunel Test ermittelten [13]. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen einen Zusammenhang: Es besteht eine negative Assoziation zwischen Gesamtspermienzahl und dem Anteil der Spermien mit DNA-Fragmentierung im Verlauf der 5 Gefriervorgänge (siehe Tabelle 6, Kapitel 4.2.4).

Auch im Hinblick auf die Motilität konnte in der vorliegenden Studie ein negativer Zusammenhang mit der DNA-Fragmentierung beobachtet werden. Steigt die Anzahl der motilen Spermien um 1 %, so nimmt der Anteil der Tunel positiven Spermien um 0,52 % über die fünf Gefrierzyklen hinweg ab (siehe Tabelle 6, Kapitel 4.2.4). Umgekehrt kommt es bei Abnahme der motilen Spermien auch zur Zunahme der DNA Fragmentierung über die Zeit hinweg. Dieser Effekt kann auch in der deskriptiven Statistik bei Betrachtung der Spermienparameter im Verlauf der Gefrier- und Auftauvorgänge beobachtet werden (Tabelle 1, Kapitel 4.1). Weng et al., (2002) konnten unabhängig von der Kryokonservierung bereits ebenfalls nachweisen, dass bei immotilen Spermien ein höherer Anteil an DNA-Fragmentierung vorliegt [136]. Auch Muratori et al., (2000) stellten die Korrelation zwischen DNA-Strangbrüchen und einer erhöhten Immotilität fest. Laut ihnen kommt es durch die DNA-Fragmentierung zu Schäden am Axonema und am Schwanz der Spermien was letztlich zu einer Immotilität führt [82]. Shen et al., (2002) konnten in ihrer Studie die erhöhte Anzahl fragmentierter DNA (gemessen mit Tunel Test) und einen Rückgang der Motilität, sowie der Vitalität beobachten [119]. Eine starke positive Korrelation der Vitalität mit der DNA-Integrität wurde auch durch Mitchell et al., (2011) [78] und Samplaski et al., (2015) [108] näher beschrieben. Laut Samplaski et al., (2015) wäre es für Patienten mit einer Vitalität über 75 % beispielsweise gar nicht mehr nötig eine Prüfung auf DNA-Fragmentierung vorzunehmen, da ein hoher Anteil vitaler Spermien ohnehin mit einer erhöhten DNA-Integrität einhergeht [108]. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Studie stützen diese These ebenfalls. Hier war ein größerer Anteil vitaler Spermien (gemessen durch Eosin-Färbung und den HOS-Test) mit einer Abnahme der DNA-Fragmentierung über die fünf Gefrierzyklen hinweg vergesellschaftet.

Ebenso besteht laut der vorliegenden Studie eine signifikante Assoziation der DNA-Fragmentierung und der Spermienmorphologie über mehrere Gefrier- und Auftauvorgänge hinweg. Bei Zunahme der abnormalen Morphologie um 1 % ist laut den vorliegenden Ergebnissen dieser Studie von einem Anstieg der Tunel positiven Spermien von 4,46 % über die einzelnen Gefrier-/Auftauzyklen hinweg auszugehen (siehe Tabelle 6, Kapitel 4.2.4). Auch

Sailer et al., (1996) veröffentlichten eine Studie, in der ein entscheidender Einfluss der Morphologie, sowohl auf die Chromatinstruktur und damit DNA-Integrität, als auch auf die Fertilität bei der Untersuchung von Bullensperma nachgewiesen werden konnte [107]. Silva et al., (2015) beschrieben ebenfalls eine negative Korrelation zwischen DNA-Fragmentierung und normaler Spermienmorphologie [120]. Wobei sie v.a. einen Zusammenhang der DNA-Schäden mit der Zunahme an amorphen Spermienköpfen feststellen konnten [120]. Ähnliche Forschungsergebnisse mit Nachweis einer Korrelation veröffentlichten Varghese et al., (2009) [130].

Bezüglich des Testergebnisses des MAR und des Tunel Tests besteht bei der vorliegenden Studie kein Zusammenhang. Es liegen auch in der Literatur keine Studien vor, die zu einem Vergleich herangezogen werden könnten.

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Studie bezüglich DNA-Fragmentierung und Apoptose, so ist dagegen von einem signifikant hohen Zusammenhang der Caspase 3 positiven Zellen und der Tunel positiven Spermien auszugehen. Bei Anstieg der Caspase 3 positiven Zellen um 1% kommt es dabei im Mittel zu einem Anstieg der Tunel positiven Zellen um 1,05 % über die fünf Gefrierzyklen hinweg (siehe Tabelle 6, Kapitel 4.2.4). Auch andere Studien gehen ebenfalls von einer starken Assoziation von Caspase 3 Positivität und DNA-Fragmentierung aus, wie beispielsweise Manente et al., (2015) [72]. Lobascio et al., (2015) gehen in ihrem Artikel davon aus, dass DNA-Fragmentierung kein (wie zuvor oft angenommenes) Resultat erhöhter reaktiver Sauerstoffspezies ist [70]. Muratori et al., (2015) bestätigen diese Aussage ebenfalls und sehen eine ablaufende Apoptose mit Aktivierung von Caspasen als Hauptgrund für das anschließende Auftreten von DNA-Fragmentierung und den oxidativen Stress lediglich als möglichen Trigger dieses Ablaufs [83]. Muratori et al., (2015) revidierten damit eine ihrer früheren Studien aus dem Jahr 2000, als sie noch nicht an eine Korrelation der DNA-Fragmentierung und der mitochondrial in Gang gesetzten Apoptose glaubten [82]. Vielmehr dachten sie, dass Spermien mit fragmentierter DNA nicht zwangsweise in die Apoptose übergehen. Als Grund für die verringerte Funktionalität der Spermien mit DNA-Fragmentierung sahen sie Spermien mit ungenügender Reifung, was gleichzeitig mit verringerter Motilität und erhöhtem Anteil abnorm geformter Spermien einherging [82]. Auch andere Studien sehen keine Korrelation zwischen DNA-Fragmentierung und der mitochondrial vermittelten Apoptose. So bemerkten Paasch et al., (2004) beispielsweise in ihrer Studie einen Anstieg von Caspase 3, 8 und 9 nach

Kryokonservierung. Dabei konnten sie allerdings keinen direkten Anstieg der DNA-Fragmentierung messen. Sie vermuteten, dass eine direkte Schädigung aufgrund der Dichten „Verpackung“ der DNA zunächst ausblieb [92]. Aitken et al., (2010) denken ebenfalls, dass die DNA-Fragmentierung nicht unbedingt Folge der Apoptosekaskade mit Caspasen ist, vielmehr führen sie die Fragmentation auf das Einwirken von oxidativen Stress zurück [3]. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten auch Thomson et al., (2009). Sie veröffentlichten eine Studie in der sie den durch die Kryokonservierung entstandenen oxidativen Stress sogar hauptsächlich für die Beschädigung der DNA verantwortlich machten [128]. Die Caspasen oder die Apoptose spielten für sie dabei nur Nebenrollen [128].

Insgesamt kann man sagen, dass es v.a. neuere Studien und aktuelle Forschungsergebnisse sind, die von einer Korrelation ausgehen. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie sprechen klar für einen positiven Zusammenhang von Caspase 3 vermittelter Apoptose und DNA-Fragmentierung.

Bei Betrachtung des Patientenalters und den Testergebnissen des DNA Tunel Tests können wir in der vorliegenden Studie ebenfalls eine statistisch signifikante Assoziation über die Zeit hinweg feststellen. Steigt das Probandenalter um 1 Jahr, so nahmen die Tunel positiven Spermien im Mittel um 0,63 % im Verlauf der Gefrier- und Auftauzyklen zu (siehe Tabelle 6, Kapitel 4.2.4). Laut einer Studie von Moskovtsev et al., (2006) kommt es mit einem Alter von 45 Jahren oder mehr zu signifikant erhöhter DNA-Fragmentierung [80]. Auch Zorn et al., (2012) konnten eine Korrelation zwischen Alter und DNA-Denaturierung nachweisen. Diese kann laut ihnen auch zu einer signifikant erniedrigten Rate an natürlich eintretenden Schwangerschaften führen [149]. Im Gegensatz dazu konnten Winkle et al., (2009) in ihrer Studie keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Patientenalter und DNA-Fragmentierung, gemessen mittels Durchflusszytometrie, nachweisen [137]. In der Studie von Braham et al., (2011) konnte ebenfalls keine Korrelation beobachtet werden [15]. Es existieren auch hier gegensätzliche Studienergebnisse. Allerdings ist zu bemerken, dass in der vorliegenden Studie trotz hauptsächlich junger teilnehmender Probanden bereits ein Zusammenhang zwischen Alter und DNA-Fragmentierung zu erkennen ist. Obwohl nur drei Probanden über 30 Jahre waren, der Älteste 44, war eine Assoziation zu erkennen. Es könnte sich jedoch hierbei aufgrund der geringen Probandenzahl nur um ein Zufallsergebnis handeln.

In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen BMI und DNA-Fragmentierung beobachtet werden. Hier kommt es in der Literatur zu kontroversen Meinungen. Eisenberg et al., (2014) berücksichtigten zusätzlich den Hüftumfang und konnten in ihrer Studienpopulation ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen DNA-Fragmentierung und BMI nachweisen [36]. Dahingegen wiesen Fariello et al., (2012) in ihrer Studie mit 305 Patienten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen übergewichtigen Patienten und einer erhöhten DNA Fragmentierung nach [40].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in der vorliegenden Studie ein negativer Zusammenhang der DNA-Fragmentierung mit der Gesamtspermienzahl, der Gesamtmotilität und der Vitalität besteht. Gleichzeitig kam es zu einem positiven Zusammenhang zwischen DNA-Fragmentierung und der abnormalen Morphologie, dem Testergebnis der Caspase 3, sowie dem Alter.

Zahlreiche Studien gehen damit konform. Es gibt aber auch Studien, die einen Zusammenhang oder eine Assoziation der DNA-Fragmentierung gemessen durch den DNA Tunel Test und den einzelnen Spermienparameter dementieren, wie beispielsweise die Studie von Chenlo et al., (2014) [27]. Sie gehen davon aus, dass eine Verschlechterung von Spermienparametern hauptsächlich durch Laborabläufe entsteht und nicht dass ein Parameter schlechten Einfluss auf einen anderen haben könnte, oder eine Vorhersage der gemessenen Spermienparameter über die DNA-Fragmentierung möglich ist [27]. Nichtsdestotrotz bleibt in der vorliegenden Studie ein statistischer Zusammenhang der DNA Fragmentierung und anderen Spermienparameter (Gesamtspermienzahl, Gesamtmotilität, Vitalität, Morphologie, Caspase 3, Alter) über die Zeit mehrerer Gefrier- und Auftauzyklen hinweg bestehen.

5.2.5 Caspase 3 positiv

Laut Shen et al., (2002) findet die Apoptose reifer Spermien bereits in der Spermatogenese ihren Ursprung. Doch das ist nicht immer der Fall. Gegebenenfalls kann die Apoptose umgangen werden und es kommt folglich zu einer verringerten Spermienqualität durch Beeinflussung anderer Spermienparameter [119]. Dagegen beobachteten May-Panloup et al., (2003), dass es bei vorliegenden Anomalitäten oder Dysfunktionen der mtDNA gehäuft zu einer schlechten Spermienqualität und damit einhergehender Unfruchtbarkeit kommt [74]. Auch Talarczyk-Desole et al., (2016) brachten die aktivierte Caspase 3 in Spermien mit

einer reduzierten Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Befruchtung in Zusammenhang [127].

In der vorliegenden Studie besteht eine statistisch signifikante Assoziation zwischen Caspase 3 positiven Spermien und der Gesamtspermienzahl, der Gesamtmotilität, der Vitalität (gemessen durch Eosin-Färbung und HOS Test), sowie der Morphologie, der DNA Fragmentation und dem Alter. Bei Zunahme, bzw. erhöhtem Wert der Gesamtspermienzahl, Gesamtmotilität und Vitalität kommt es zur Abnahme, bzw. geringerer Anzahl der Caspase 3 positiven Zellen (siehe Tabelle 7, Kapitel 4.2.5).

Auch Talarczyk-Desole et al., (2016) beschrieben eine negative Korrelation aktivierter Caspase 3, lokalisiert im Mittelstück der Spermien und der Spermatozoendichte, der Motilität, der Vitalität sowie der normalen Morphologie [127]. Weng et al., (2002) stellten ein erhöhtes Vorkommen der Caspase 3 bei immotilen Spermien fest [136]. Allerdings sind sie sich nicht sicher, ob eine erhöhte Anzahl immotiler Spermien Auslöser oder Folge einer erhöhten Aktivierung von Caspase 3 ist [136]. Silva et al., (2015) konnten in ihrer Studie ebenfalls eine Korrelation Caspase 3 positiver Spermien und der Motilität nachweisen [120].

Die abnormale Morphologie steht in der vorliegenden Studie in positiver Assoziation mit der DNA-Fragmentierung. Kommt es zur Zunahme der abnormalen Spermienmorphologie um 1 %, liegen im Mittel 5,61 % mehr Caspase 3 positive Spermien vor (siehe Tabelle 7, Kapitel 4.2.5). Wie oben im Text bereits erwähnt, konnten auch Talarczyk-Desole et al., (2016) eine negative Korrelation zwischen aktivierter Caspase 3 und normaler Spermienmorphologie feststellen [127].

Auch im Hinblick auf die DNA-Fragmentierung liegt in der vorliegenden Studie eine positive Assoziation mit den Caspase 3 positiven Spermien vor. Kommt es zur Zunahme der Tunel positiven Spermien um 1%, so ist über die fünf Gefrierzyklen hinweg mit einer erhöhten Anzahl an Caspase 3 positiven Spermien von 0,7 % zu rechnen (siehe Tabelle 7, Kapitel 4.2.5). Manente et al., (2015) konnten den statistisch signifikanten Zusammenhang von Caspase 3 und der DNA-Fragmentierung von Spermien in ihrer Studie ebenfalls darstellen [72]. Auch Weng et al., (2002) beschrieben die positive Korrelation zwischen aktivierter Caspase 3 und DNA-Fragmentierung gemessen durch den Tunel Test [136].

Der Einfluss des Alters auf die Apoptose und somit vermehrtem Auftreten der Caspase 3 ist noch nicht abschließend geklärt. In der vorliegenden Studie zeigt sich ein positiver Zusammenhang der Parameter nur vor Adjustierung des p-Wertes. Im Schnitt wäre bei

einem höheren Alter auch eine erhöhte Anzahl an Caspase 3 positiven, apoptotischen Spermien zu erwarten (im Verlauf der Gefrier- und Auftauzyklen). Das würde bedeuten, dass die Resistenz der Spermien gegenüber der Kryokonservierung durch ein erhöhtes Alter vermindert wird. Vergleicht man das Ergebnis mit der Literatur, so stellt man fest, dass Zorn et al., (2012) beispielsweise in ihrer Studie eine negative Korrelation zwischen dem mitochondrialen Membranpotenzial und dem Alter beschrieben [149]. Die Mitochondrien und deren Membranpotenzial sind entscheidend für die Auslösung der Apoptosekaskade und auch der Aktivierung von Caspase 3 (Kapitel 2.3.2). So konnten Zorn et al., (2012) auch einen Zusammenhang zwischen männlichem Alter und der Rate an Apoptose in Spermien feststellen [149]. Es gibt noch nicht ausreichend Informationen und Studien, um hierzu eine abschließende Aussage zu treffen. Allerdings könnte eine positive Assoziation zwischen der mitochondrialen (durch Caspase 3 vermittelten) Apoptose und dem Alter wahrscheinlich sein.

Ähnlich schwer fällt die Beurteilung einer möglichen Korrelation zwischen dem vermehrten Auftreten von Apoptose Markern wie Caspase 3 und dem BMI. In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang der beiden Parameter beobachtet werden. Allerdings bestehen konträre Forschungsergebnisse in der Literatur. Fariello et al., (2012) wiesen eine verminderte mitochondriale Aktivität bei übergewichtigen Patienten nach [40]. Weiterhin konnten Zorn et al., (2012) eine Korrelation zwischen dem BMI und der Apoptoserate beobachten [149]. Insgesamt fällt eine Beurteilung eines möglichen Zusammenhangs zwischen BMI und mitochondrialer Apoptose bei Spermien schwer.

Zusammenfassend besteht eine negative Assoziation zwischen mitochondrialer Apoptose und Gesamtspermienzahl, Gesamtmotilität, sowie Vitalität. Eine positive Assoziation liegt zwischen der mitochondrialen Apoptose und der abnormen Morphologie, der DNA-Fragmentierung und dem Alter vor.

5.3 Prädiktion der Schädigung durch Kryokonservierung

Es ist sehr schwierig, eine Vorhersage der möglichen Schädigung durch die Kryokonservierung zu treffen. Hauptsächlich auch deshalb, weil es wohl immer auch abhängig von den Spermienparametern und der „Qualität“ jedes einzelnen Ejakulats ist. Allgemein gesehen ist bei schlechteren Spermienparametern, insbesondere auch bei erhöhten DNA-Schäden oder Fragmentation mit einer Infertilität der Patienten zu rechnen [148]. Schlimmstenfalls kann es laut einer veröffentlichten Studie von Zini et al., (2001) auch zu einem erhöhten Risiko an genetischen Erkrankungen kommen, sollte es zur Befruchtung mit einem Spermium kommen, dessen DNA geschädigt ist [148]. Hammadeh et al., (1999) machten außerdem darauf aufmerksam, dass v.a. Patienten die als subfertil oder infertil eingestuft werden einen signifikant höheren Schaden durch die Kryokonservierung erfahren als fertile Patienten [52].

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass es durch die Kryokonservierung zur Schädigung der Spermien und zur Verschlechterung der einzelnen Spermienparameter auch bei fertilen Probanden kommt. Betrachtet man die Abbildung 29 in Kapitel 4.3 so kann man an unseren Daten erkennen, dass die einzelnen Parameter unterschiedlich „stark“ anfällig für die Kryokonservierung sind. So kommt es v.a. zu einem starken Abfall der Motilität und auch der Vitalität: Man kann einen exponentiellen Abfall der Parameter über die Zeit hinweg beobachten. Dahingegen nehmen die Schädigung der nukleären DNA und die mitochondrialen Apoptose, vermittelt durch Caspase 3, stetig und gleichbleibend zu. Die Mediane stellen hier eine ansteigende Gerade dar. Die abnormale Morphologie nimmt nur minimal zu und bildet fast eine horizontale Gerade. Der Verlauf, bzw. die Entwicklung der Spermienparameter über die einzelnen Gefrier-/Auftauzyklen hinweg ist nur schwerlich mit anderen Studien vergleichbar, da dies unserer Kenntnis nach die erste Studie ist, die den Verlauf der Parameter über fünf Gefrier- und Auftauzyklen hinweg untersuchte. Weitere Studien mit größeren Studienpopulationen sind nötig, um eine bessere Aussage über die Prädiktion der Spermenschädigung durch Kryokonservierung zu treffen.

Zusätzlich ist weitere Forschung nötig, um die durch die Kryokonservierung entstandene Schädigung der Spermien weitestgehend gering zu halten. Insbesondere die Protektion von Motilität und Vitalität der Spermien könnte bei zukünftigen Studien im Vordergrund stehen, da diese beiden Parameter besonders stark von der Kryokonservierung beeinflusst werden.

5.4 Schlussfolgerung

- I. Während der fünf Einfrier- und Auftauzyklen kommt es insgesamt zur Abnahme der Gesamtspermienzahl (eingeschlossen Volumen und Spermatozoendichte), der Motilität und der Vitalität. Gleichzeitig nehmen die abnorme Morphologie, die nukleäre DNA-Fragmentierung, sowie die mitochondriale (durch Caspase 3 vermittelte) Apoptose zu.
- II. Es bestehen ausgeprägte Zusammenhänge der einzelnen Spermienparameter. Wichtig ist hierbei zu beachten, dass die Assoziation der Parameter stets über mehrere Gefrier- und Auftauvorgänge besteht:

Abhängige Variable	Positiver Zusammenhang	Negativer Zusammenhang
Motilität	Gesamtspermienzahl, Vitalität	Abnormale Morphologie, DNA-Fragmentierung, mitochondriale Apoptose
Vitalität	Gesamtmotilität	Abnormale Morphologie
Abnormale Morphologie	DNA-Fragmentierung, mitochondriale Apoptose	Motilität, Vitalität
DNA-Fragmentierung	Abnormale Morphologie, mitochondriale Apoptose	Gesamtspermienzahl, Motilität, Vitalität
Mitochondriale Apoptose	Abnormale Morphologie, DNA-Fragmentierung	Gesamtspermienzahl, Motilität, Vitalität

Tabelle 8

Zusammenhänge der einzelnen Spermienparameter

- III. Es besteht eine positive Assoziation zwischen Alter und der DNA-Fragmentierung, sowie der mitochondrialen Apoptose. Die Spermien älterer Probanden haben somit eine schlechtere Resistenz im Hinblick auf DNA-Fragmentierung und mitochondrialer Apoptose gegenüber der Kryokonservierung. Außerdem kann ein positiver Zusammenhang zwischen BMI und Gesamtmotilität beobachtet werden: Bei erhöhtem BMI besteht eine bessere Resistenz der Motilität gegenüber der Kryokonservierung. Ein vermehrtes Auftreten von Antikörpern scheint keinen Einfluss auf die Resistenz der Spermien gegenüber Kryokonservierung zu haben.
- IV. Die Spermiovitalität und die Gesamtmotilität nehmen über die einzelnen Gefrierzyklen exponentiell ab (siehe Abbildung 29, Kapitel 4.3). Diese Werte scheinen am anfälligsten für die Schädigung durch die Kryokonservierung. Gleichzeitig nehmen die nukleäre DNA-

Fragmentierung, die mitochondriale Apoptose und die abnormale Morphologie mit jedem Gefrierzyklus linear zu.

6 Literaturverzeichnis

1. Agarwal A, Durairajanayagam D, du Plessis SS (2014) Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod Biol Endocrinol* 12:1–19. doi: 10.1186/1477-7827-12-112
2. Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA et al (2006) Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril* 86:503–512. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.02.088
3. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM et al (2010) Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod* 25:2415–2426. doi: 10.1093/humrep/deq214
4. Al-Khanak K, Zakhariev Z, Spasova D et al (1985) [Viscosity, pH and the protective properties of the diluents of bull seminal fluid after cryoconservation]. *Vet Med Nauki* 22:53–59.
5. Anifandis G, Dafopoulos K, Messini CI et al (2013) The BMI of men and not sperm parameters impact on embryo quality and the IVF outcome. *Andrology* 1:85–89. doi: 10.1111/j.2047-2927.2012.00012.x
6. Asghari A, Khaki AA, Rajabzadeh A, Khaki A (2016) A review on Electromagnetic fields (EMFs) and the reproductive system. *Electron physician* 8:2655–2662. doi: 10.19082/2655
7. Ashe PC, Berry MD (2003) Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 27:199–214. doi: 10.1016/S0278-5846(03)00016-2
8. Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A et al (2007) Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. *J Androl* 28:613–620. doi: 10.2164/jandrol.106.001966
9. Bandularatne E, Bongso A (1990) Evaluation of human sperm function after repeated freezing and thawing. *J Androl* 23:242–249.
10. Beginn Z, Oliver A, Brown L, Kinder M (2012) Leben aus dem Reagenzglas - 30 Jahre künstliche Befruchtung. *Badische Zeitung*

11. Benninghoff A, Drenckhahn D (2008) Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1. Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem S. 806–807. Elsevier/ Urban & Fischer, München
12. Björndahl L, Söderlund I, Kvist U (2003) Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod* 18:813–816. doi: 10.1093/humrep/deg199
13. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D et al (2006) Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 21:2876–2881. doi: 10.1093/humrep/del251
14. Botchan A, Karpol S, Lehavi O et al (2013) Preservation of sperm of cancer patients: extent of use and pregnancy outcome in a tertiary infertility center. *Asian J Androl* 15:382–386. doi: 10.1038/aja.2013.3
15. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A (2011) The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet* 28:425–432. doi: 10.1007/s10815-011-9537-5
16. Brandriff BF, Meistrich ML, Gordon LA et al (1994) Chromosomal damage in sperm of patients surviving Hodgkin's disease following MOPP (nitrogen mustard, vincristine, procarbazine, and prednisone) therapy with and without radiotherapy. *Hum Genet* 93:295–9.
17. Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S, Nieschlag E (1995) Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J Reprod Fertil* 105:25–33.
18. Bujan L, Daudin M, Moinard N et al (2007) Azoospermic HIV-1 infected patients wishing to have children: Proposed strategy to reduce HIV-1 transmission risk during sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection: Case report. *Hum Reprod* 22:2377–2381. doi: 10.1093/humrep/dem175
19. Bundesärztekammer (2006) Durchführung der assistierten Reproduktion. *Dtsch Arztebl* 103:1392–1403.

20. Bundesministerium für Familie Senioren Frauen und Jugend (2015) Kinderlose Frauen und Männer. Gewollte oder ungewollte Kinderlosigkeit im Lebenslauf und Nutzung von Unterstützungsangeboten. <https://www.informationsportal-kinderwunsch.de/fileadmin/templates/pdf/BMFSFJ-Kinderwunsch-kinderlose-Frauen-und-Maenner-Befragung.pdf> 10
21. Bungum M, Humaidan P, Spano M et al (2004) The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 19:1401–1408. doi: 10.1093/humrep/deh280
22. Cassina Adriana, Silveira P, Cantu L, Montes JM, Radi R SR (2015) Defective Human Sperm Cells Are Associated with Mitochondrial Dysfunction and Oxidant Production. *Biol Reprod* 93:119, 1–10. doi: 10.1095/biolreprod.115.130989
23. Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH (1992) Cryopreservation of Human Semen: Comparison of Cryopreservatives, Sources of Variability, and Prediction of Post-thaw Survival. *J Androl* 13:283–288.
24. Ceric F, Silva D, Vigil P (2005) Ultrastructure of the human periovulatory cervical mucus. *J Electron Microsc (Tokyo)* 54:479–484. doi: 10.1093/jmicro/dfh106
25. Chang MC (1984) The meaning of sperm capacitation. A historical perspective. *J Androl* 5:45–50.
26. Chemes EH, Rawe YV (2003) Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 9:405–428.
27. Chenlo PH, Curi SM, Pugliese MN et al (2014) Fragmentation of sperm DNA using the TUNEL method. *Actas Urol Esp* 38:608–612. doi: 10.1016/j.acuro.2014.02.022
28. Clifton DK, Bremner WJ (1983) The Effect of Testicular X-irradiation on Spermatogenesis in Man: A Comparison with the Mouse. *J Androl* 4:387–392. doi: 10.1002/j.1939-4640.1983.tb00765.x
29. Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A et al (2008) Age-Related Increase of Reactive Oxygen Species in Neat Semen in Healthy Fertile Men. *Urology* 71:490–494. doi: 10.1016/j.urology.2007.11.041
30. Davidson LM, Millar K, Jones C et al (2015) Deleterious effects of obesity upon the hormonal and molecular mechanisms controlling spermatogenesis and male fertility. *Hum Fertil (Camb)* 18:184–93. doi: 10.3109/14647273.2015.1070438

31. DeLuca SZ, O'Farrell PH (2012) Barriers to Male Transmission of Mitochondrial DNA in Sperm Development. *Dev Cell* 22:660–668. doi: 10.1016/j.devcel.2011.12.021
32. Deutsches IVF-Register (2016) Jahrbuch 2015 DIR. *J für Reproduktionsmedizin und Endokrinol* 13:1–55.
33. Dobrzynska MM, Tyrkiel E, Derezińska E, Ludwicki J (2010) Is concentration and motility of male gametes related to DNA damage measured by comet assay? *Ann Agric Environ Med* 17:73–77.
34. Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE (2000) Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod* 15:1552–1561. doi: 10.1093/humrep/15.7.1552
35. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE (2001) Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* {(Oxford,} England) 16:1191–1199.
36. Eisenberg ML, Kim S, Chen Z et al (2014) The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study. *Hum Reprod* 29:193–200. doi: 10.1093/humrep/det428
37. El-Ghobashy a a, West CR (2003) The human sperm head: a key for successful fertilization. *J Androl* 24:232–238.
38. Elia J, Delfino M, Imbrogno N et al (2009) Human semen hyperviscosity: prevalence, pathogenesis and therapeutic aspects. *Asian J Androl* 11:609–615. doi: aja200946 [pii]\r10.1038/aja.2009.46
39. Fariello RM, Del Giudice PT, Spaine DM et al (2009) Effect of leukocytospermia and processing by discontinuous density gradient on sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity. *J Assist Reprod Genet* 26:151–157. doi: 10.1007/s10815-008-9288-0
40. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM et al (2012) Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int* 110:863–867. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10813.x
41. Fawcett DW (1975) The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 44:394–436. doi: 10.1016/0012-1606(75)90411-X
42. Fawcett DW, Anderson WA, Phillips DM (1971) Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Dev Biol* 26:220–251.

43. Fukunaga N, Haigo K, Kyono K, Araki Y (2001) Efficiency of using frozen-thawed testicular sperm for multiple intracytoplasmic sperm injections. *J Assist Reprod Genet* 18:634–637. doi: 10.1023/A:1013107132110
44. Gandini L, Lombardo F, Paoli D et al (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15:830–839. doi: 10.1093/humrep/15.4.830
45. Gandini L, Lombardo F, Paoli D et al (2004) Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 19:1409–1417. doi: 10.1093/humrep/deh233
46. Georg Löffler, Petro E. Petrides PCH (2007) *Biochemie und Pathobiochemie* S.148, 8. Auflage. Springer
47. Georg Löffler, Petro E. Petrides PCH (2007) *Biochemie und Pathobiochemie* S. 203 - 204, 8. Auflage. Springer
48. Giraud MN, Motta C, Boucher D, Grizard G (2000) Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 15:2160–2164. doi: 10.1093/humrep/15.10.2160
49. Gregory L, Booth AD, Wells C, Walker SM (1994) A study of the cumulus-corona cell complex in in-vitro fertilization and embryo transfer; a prognostic indicator of the failure of implantation. *Hum Reprod* 9:1308–1317.
50. Grunewald S, Kriegel C, Baumann T et al (2009) Interactions between apoptotic signal transduction and capacitation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 24:2071–2078. doi: 10.1093/humrep/dep178
51. Halliday J (2012) Outcomes for offspring of men having ICSI for male factor infertility. *Asian J Androl* 14:116–120. doi: 10.1038/aja.2011.71
52. Hammadeh ME, Askari AS, Georg T et al (1999) Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl* 22:155–162. doi: 10.1046/j.1365-2605.1999.00162.x
53. Hammadeh ME, Dehn C, Hippach M et al (2001) Comparison between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. *Int J Androl* 24:66–72. doi: 10.1046/j.1365-2605.2001.00270.x

54. Hammadeh ME, Szarvasy D, Zeginiadou T et al (2001) Evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow (programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze-thawing techniques. *J Assist Reprod Genet* 18:364–70. doi: 10.1023/A:1016666221500
55. Hammitt DG, Martin PA (1989) Correlations among assays of porcine semen quality following cryopreservation. *Theriogenology* 32:369–384.
56. Hofmann A, Holstein A, Rüdiger HW et al (1999) Fertilitätsstörungen und Fruchtschädigung durch Arbeitsstoffe. DCM - Druck Center Meckenheim
57. Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 6:65–70.
58. Hossain A, Osuamkpe C, Hossain S, Phelps JY (2010) Spontaneously developed tail swellings (SDTS) influence the accuracy of the hypo-osmotic swelling test (HOS-test) in determining membrane integrity and viability of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 27:83–86. doi: 10.1007/s10815-009-9375-x
59. Ito C, Toshimori K (2016) Acrosome markers of human sperm. *Anat Sci Int* 91:128–142. doi: 10.1007/s12565-015-0323-9
60. Janning W, Knust E (2004) Genetik (Allgemeine Genetik, Molekulare Genetik, Entwicklungs-genetik) S. 7 - 21. Thieme Verlag
61. Jenkins TG, Aston KI, Cairns BR, Carrell DT (2013) Paternal aging and associated intraindividual alterations of global sperm 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine levels. *Fertil Steril* 100:945–951. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.05.039
62. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M et al (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70:219–228. doi: 10.1530/jrf.0.0700219
63. Kalsi J, Thum MY, Muneer A et al (2011) Analysis of the outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh or frozen sperm. *BJU Int* 107:1124–1128. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09545.x
64. Keel BA, Webster BW, Roberts DK (1987) Effects of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81:213–220.
65. Kumar S, Murarka S, Mishra V V., Gautam AK (2014) Environmental & lifestyle factors in deterioration of male reproductive health. *Indian J Med Res* 140:29–35.

66. Larsson NG, Oldfors A, Garman JD et al (1997) Down-regulation of mitochondrial transcription factor A during spermatogenesis in humans. *Hum Mol Genet* 6:185–191. doi: 10.1093/hmg/6.2.185
67. Lee J, Richburg JH, Younking SC, Boekelheide K (1997) The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138:2081–2088. doi: 10.1016/S0022-5347(01)62980-X
68. Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R (1996) Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 11:1942–1946. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019521
69. Linck RW, Chemes H, Albertini DF (2016) The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility. *J Assist Reprod Genet* 33:141–156. doi: 10.1007/s10815-016-0652-1
70. Lobascio AM, De Felici M, Anibaldi M et al (2015) Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *Andrology* 3:265–270. doi: 10.1111/andr.302
71. Macdonald AA, Stewart AW, Farquhar CM (2013) Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones in New Zealand men: a cross-sectional study in fertility clinics. *Hum Reprod* 28:3178–3187. doi: 10.1093/humrep/det379
72. Manente L, Pecoraro S, Picillo E et al (2015) Molecular evidence of apoptotic pathway activation in semen samples with high DNA fragmentation. *In Vivo* 29:289–294.
73. Mangiarini A, Paffoni A, Restelli L et al (2013) Specific sperm defects are differentially correlated with DNA fragmentation in both normozoospermic and teratozoospermic subjects. *Andrology* 1:838–844. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00138.x
74. May-Panloup P, Chrétien MF, Savagner F et al (2003) Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Hum Reprod* 18:550–556. doi: 10.1093/humrep/deg096
75. medeaLAB Morphology Analyser (2010) medeaLAB Morphology Analyser Version 1.2, April 2010, User Manual. page 7.
76. MEDI-Learn MEDI-LEARN Skript Histologie 3, 6. Auflage, Abbildung 23. www.medi-learn.de/histo3-23 38.

77. Meryman HT (1956) Mechanics of Freezing in Living Cells and Tissues. *Science* (80-) 124:515–521. doi: 10.1126/science.124.3221.515
78. Mitchell LA, De Iuliis GN, Aitken RJ (2011) The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *Int J Androl* 34:2–13. doi: 10.1111/j.1365-2605.2009.01042.x
79. Morris GJ (2006) Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Hum Reprod* 21:2075–2083. doi: 10.1093/humrep/del116
80. Moskovtsev SI, Willis J, Mullen JBM (2006) Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril* 85:496–499. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.05.075
81. Mossad H, Morshedi M, Toner JP, Oehninger S (1994) Impact of cryopreservation on spermatozoa from infertile men: implications for artificial insemination. *Arch Androl* 33:51–57.
82. Muratori M, Piomboni P, Baldi E et al (2000) Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 21:903–912.
83. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S et al (2015) Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med* 21:109–122. doi: 10.2119/molmed.2014.00158
84. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (2009) *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* S. 18 - 65, 3. Auflage. Springer, Heidelberg
85. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (2009) *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* S. 73 - 74, 3. Auflage. Springer, Heidelberg
86. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (2009) *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* S. 367 - 380, 3. Auflage. Springer, Heidelberg
87. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (2009) *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* S. 199 - 254, 3. Auflage. Springer, Heidelberg
88. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (2009) *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* S. 517 - 527, 3. Auflage. Springer, Heidelberg
89. O’Connell M, McClure N, Lewis SEM (2002) The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 17:704–709. doi: 10.1093/humrep/17.3.704

90. Omu AE (2013) Sperm parameters: Paradigmatic index of good health and longevity. *Med Princ Pract* 22:30–42. doi: 10.1159/000354208
91. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A et al (2008) Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 25:403–411. doi: 10.1007/s10815-008-9232-3
92. Paasch U, Sharma RK, Gupta AK et al (2004) Cryopreservation and Thawing Is Associated with Varying Extent of Activation of Apoptotic Machinery in Subsets of Ejaculated Human Spermatozoa. *Biol Reprod* 71:1828–1837. doi: 10.1095/biolreprod.103.025627
93. Pajarinen JT, Karhunen PJ (1994) Spermatogenic arrest and ‘Sertoli cell-only’ syndrome—common alcohol-induced disorders of the human testis. *Int J Androl* 17:292–299. doi: 10.1111/j.1365-2605.1994.tb01259.x
94. Parinaud J, Vieitez G, Moutaffian H et al (1996) Relationships between motility parameters, morphology and acrosomal status of human spermatozoa. *Hum Reprod* 11:1240–1243.
95. Pelfrey RJ, Overstreet JW, Lewis EL (1982) Abnormalities of sperm morphology in cases of persistent infertility after vasectomy reversal. *Fertil Steril* 38:112–4.
96. Petyim S, Neungton C, Thanaboonyawat I et al (2014) Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation. *J Assist Reprod Genet* 31:1673–1680. doi: 10.1007/s10815-014-0332-y
97. Plas E, Berger P, Hermann M, Pflüger H (2000) Effects of aging on male fertility? *Exp Gerontol* 35:543–551. doi: 10.1016/S0531-5565(00)00120-0
98. Pons-Rejraji H, Brugnion F, Sion B et al (2014) Evaluation of atorvastatin efficacy and toxicity on spermatozoa, accessory glands and gonadal hormones of healthy men: a pilot prospective clinical trial. *Reprod Biol Endocrinol* 12:65. doi: 10.1186/1477-7827-12-65
99. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Storgaard L et al (2007) Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *Am J Epidemiol* 165:1372–1379. doi: 10.1093/aje/kwm032
100. Ramzan MH, Ramzan M, Khan MM et al (2015) Human semen quality and sperm DNA damage assessed by comet assay in clinical groups. *Turkish J Med Sci* 45:729–737.

101. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2012) Biochemie - Duale Reihe - Zellorganelle S. 362 - 365. Biochemie. doi: 10.1055/b-0034-5588
102. Rassow J, Hauser K, Roland N, Deutzmann R (2012) Biochemie - Duale Reihe S. 417 - 423, 3. Auflage. Thieme Verlag
103. Rassow J, Hauser K, Roland N, Deutzmann R (2012) Biochemie - Duale Reihe S. 506 - 511, 3. Auflage. Thieme Verlag
104. Richthoff J, Elzanaty S, Rylander L et al (2008) Association between tobacco exposure and reproductive parameters in adolescent males. *Int J Androl* 31:31–39. doi: 10.1111/j.1365-2605.2007.00752.x
105. Said TM, Gaglani A, Agarwal A (2010) Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online* 21:456–462. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.05.011
106. Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A (2004) Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update* 10:39–51. doi: 10.1093/humupd/dmh003
107. Sailer BL, Tost LK, Evenson DP (1996) Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry* 24:167–173. doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(19960601)24:2<167::AID-CYTO9>3.0.CO;2-G
108. Samplaski MK, Dimitromanolakis A, Lo KC et al (2015) The relationship between sperm viability and DNA fragmentation rates. *Reprod Biol Endocrinol* 13:1–6. doi: 10.1186/s12958-015-0035-y
109. Schultz DR, Harrington WJ (2003) Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 32:345–369. doi: 10.1053/sarh.2003.50005
110. Schünke M, Schulte E, Schumacher U et al (2009) Prometheus, Innere Organe S. 324 - 340, 2. Auflage. Thieme Verlag
111. Semprini AE, Levi-Setti P, Bozzo M et al (1992) Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet* 340:1317–1319. doi: 10.1016/0140-6736(92)92495-2
112. Sergerie M, Laforest G, Bujan L et al (2005) Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 20:3446–3451. doi: 10.1093/humrep/dei231
113. Setchell BP (1998) The Parkes Lecture Heat and the testis. *Reproduction* 114:179–194. doi: 10.1530/jrf.0.1140179

114. Sharma R, Ahmad G, Esteves SC, Agarwal A (2016) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control. *J Assist Reprod Genet* 33:291–300. doi: 10.1007/s10815-015-0635-7
115. Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R et al (2010) TUNEL as a Test for Sperm DNA Damage in the Evaluation of Male Infertility. *Urology* 76:1380–1386. doi: 10.1016/j.urology.2010.04.036
116. Sharpe RM, Skakkebaek NE (1993) Falling Reproductive: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341:1392–1395. doi: 10.1016/0140-6736(93)90953-E
117. Shaw JM, Jones GM (2003) Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 9:583–605. doi: 10.1093/humupd/dmg041
118. Sheiner EK, Sheiner E, Hammel RD et al (2003) Effect of occupational exposures on male fertility: literature review. *Ind Health* 41:55–62. doi: 10.2486/indhealth.41.55
119. Shen H-M, Dai J, Chia S-E et al (2002) Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 17:1266–1273.
120. Silva JV, Freitas MJ, Correia BR et al (2015) Profiling signaling proteins in human spermatozoa: biomarker identification for sperm quality evaluation. *Fertil Steril* 104:845–856.e8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.06.039
121. Simon L, Murphy K, Shamsi MB et al (2014) Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod* 29:2402–2412. doi: 10.1093/humrep/deu228
122. Smit M, Romijn JC, Wildhagen MF et al (2010) Sperm chromatin structure is associated with the quality of spermatogenesis in infertile patients. *Fertil Steril* 94:1748–1752. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.030
123. Song WH, Ballard JWO, Yi YJ, Sutovsky P (2014) Regulation of mitochondrial genome inheritance by autophagy and ubiquitin-proteasome system: Implications for health, fitness, and fertility. *Biomed Res Int* 2014:1–16. doi: 10.1155/2014/981867

124. Sonnenburg D.W., Brames M.J., Case-Eads S. ELH (2015) Utilization of sperm banking and barriers to its use in testicular cancer patients. *Support Care Cancer*, Springer 23:2763–2768. doi: 10.1007/s00520-015-2641-9
125. Stöckl D, Nörtemann M (2014) *Gynäkologie in Frage und Antwort* S. 120 - 123, 3. Auflage. Urban und Fischer
126. Storgaard L, Bonde JP, Olsen J (2006) Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure: A review of published epidemiological studies. *Reprod Toxicol* 21:4–15. doi: 10.1016/j.reprotox.2005.05.006
127. Talarczyk-Desole J, Kotwicka M, Jendraszak M et al (2016) Sperm midpiece apoptotic markers: impact on fertilizing potential in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Cell* 29:67–75. doi: 10.1007/s13577-015-0129-z
128. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ et al (2009) Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod* 24:2061–2070. doi: 10.1093/humrep/dep214
129. Thomson LK, Fleming SD, Barone K et al (2010) The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 93:1147–1156. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.11.023
130. Varghese AC, Bragais FM, Mukhopadhyay D et al (2009) Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrologia* 41:207–215. doi: 10.1111/j.1439-0272.2009.00917.x
131. Vawda AI, Gunby J, Younglai E V (1996) Semen parameters as predictors of in-vitro fertilization: the importance of strict criteria sperm morphology. *Hum Reprod* 11:1445–1450.
132. Van der Ven H, Perez-Pelaez M, Crabo B, LJD Z (1984) Reproduced from Jeyendran RS. *J Reprod Fertil* 70:219–228.
133. Van der Ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S et al (1986) Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. *J Androl* 7:190–6.
134. Watson PF (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7:871–891. doi: 10.1071/RD9950871

135. Wei TC, Huang WJ, Lin ATL, Chen KK (2013) The role of hormones on semen parameters in patients with idiopathic or varicocele-related oligoasthenoteratozoospermia (OAT) syndrome. *J Chinese Med Assoc* 76:624–628. doi: 10.1016/j.jcma.2013.07.005
136. Weng S-L, Taylor SL, Morshedi M et al (2002) Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 8:984–991. doi: 10.1093/molehr/8.11.984
137. Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F et al (2009) The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J Assist Reprod Genet* 26:41–46. doi: 10.1007/s10815-008-9277-3
138. World Health Organization, Edition Fifth (2010) Examination and processing of human semen. *World Health Edition*, V:286. doi: 10.1038/aja.2008.57
139. Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy MP (2014) Review of Azoospermia. *Spermatogenesis* 4:e28218. doi: 10.4161/spmg.28218
140. Wu Y, Kang X, Zheng H et al (2016) Effect of Paternal Age on Reproductive Outcomes of Intracytoplasmic Sperm Injection. *PLoS One* 11:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0149867
141. www.embryology.ch
<http://www.embryology.ch/allemand/cgametogen/spermato03.html#entwicklung>.
142. www.visembryo.com <http://www.visembryo.com/story4325.html>
<http://www.visembryo.com/images/histone%20formation%20Nature-Genomic%20biology.jpg>.
143. Yildirim ME, Kaynar M, Badem H et al (2015) What is harmful for male fertility: cell phone or the wireless Internet? *Kaohsiung J Med Sci* 31:480–484. doi: 10.1016/j.kjms.2015.06.006
144. Zhang MH, Shi Z Da, Yu JC et al (2015) Scrotal heat stress causes sperm chromatin damage and cysteinyl aspartate-specific proteinases 3 changes in fertile men. *J Assist Reprod Genet* 32:747–755. doi: 10.1007/s10815-015-0451-0
145. Zhou J, Chen L, Li J et al (2015) The semen pH affects sperm motility and capacitation. *PLoS One* 10:1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0132974

146. Zhuang J, Dinsdale D, Cohen GM (1998) Apoptosis, in human monocytic THP.1 cells, results in the release of cytochrome c from mitochondria prior to their ultracondensation, formation of outer membrane discontinuities and reduction in inner membrane potential. *Cell Death Differ* 5:953–962. doi: 10.1038/sj.cdd.4400440
147. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR (2001) The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92:57–70. doi: 10.1016/S0163-7258(01)00159-0
148. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT (2001) Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 75:674–677. doi: 10.1016/S0015-0282(00)01796-9
149. Zorn B, Golob B, Ihan A et al (2012) Apoptotic sperm biomarkers and their correlation with conventional sperm parameters and male fertility potential. *J Assist Reprod Genet* 29:357–364. doi: 10.1007/s10815-012-9718-x
150. www.embryology.ch.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich noch herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben und somit im Wesentlichen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. M. E. Hammadeh für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung danken. Als Doktorvater und Betreuer war er stets ein zuverlässiger Ansprechpartner bei allen Fragen die während der Bearbeitung des Themas aufgetreten sind.

Herrn Prof. Dr. Solomayer danke ich für die Ermöglichung der Versuche und die Nutzungsmöglichkeit der Laborräume.

Mein herzlicher Dank gilt den Mitarbeitern im IVF-Labor für ihr Entgegenkommen und die Aufnahme im Labor.

Herrn Prof. Wagenpfeil und Herrn Schöpe möchte ich für die Zurverfügungstellung des Statistik-Programms SPSS und die Beratung bei der statistischen Auswertung danken.

Der HNO-Klinik und ihren Mitarbeitern danke ich für die Nutzungsmöglichkeit des Fluoreszenzmikroskops.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Lisa und meinem Freund Lukas, die mich immer unterstützen und mir in jeder Lebenslage zur Seite stehen.

8 Anhang

Anhang 1: Spermogramm der Frauenklinik des Universitätsklinikums des Saarlandes

Universitätsklinikum des Saarlandes

Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin
IVF -Labor

Direktor: Prof. Dr. E.-F. Solomayer



Patient :
Patientin:

Vorname:
Vorname:

Geb:
Geb:

Nr.

Nr.:

Nr.:

Nr.:

Untersuchung/ Datum	Normwerte WHO 2010				
Volumen (ml)	1.5 (1,4-1,7)				
PH	≥7.2				
Viskosität					
Gesamtspermienzahl (Mill/ml)	39 (33-46)				
Spermatozoendichte (Mill/ml)	15 (12-16)				
Motilität (%)	Gesamtmotilität (PR+NP)	40 (38-42)			
	PR	32 (31-34)			
	NP				
	IM				
Vitalität (%)	Eosin	≥50 (55-63)			
	HOS Vor				
	HOS Nach				
Morphologie Vor (%)	Normal	4 (3,0-4,0)			
Morphologie Nach (%)	Normal				
Cyturtest (Leukozyten)	< 1 Mill/ml				
MAR-Test (%)	<50				
Aufbereitungsmethode					
Dichte (Mill/ml)					
Motilität (%)	Gesamt Motilität (PR +NP)				
	PR				
	NP				
	IM				
Größe (m)					
Gewicht (kg)					
Nikotin / Tag					
Medikamente					

Beurteilung: